



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO CARLO BO
DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMOLECOLARI

Dottorato di Ricerca in
Metodologie Biochimiche e Farmacologiche
Ciclo XXVIII
SSD BIO/13

Utilizzo di molecole pro-glutazione
per modulare la risposta immunitaria
Th1/Th2 durante le infezioni virali

Relatrice: Chiar.ma Prof.ssa
ALESSANDRA FRATERNALE

Dottoranda: Dott.ssa
SERENA BRUNDU

Anno Accademico 2014/2015

Ai miei nonni

INDICE

1. INTRODUZIONE	5
1.1 Il glutatione ridotto	5
1.2 Il GSH in condizioni patologiche	7
1.3 Il GSH nelle infezioni virali	9
1.4 Il GSH e l'invecchiamento	11
1.5 Le interleuchine e il differenziamento dei linfociti Th	12
1.6 Il ruolo del GSH sullo sviluppo di una risposta Th1 o Th2	14
1.7 Le molecole pro-GSH	15
1.8 I-152 e GSH-C4	18
2. SCOPO DELLA TESI	19
3. MATERIALI E METODI	21
3.1 Reagenti	21
3.2 Animali	21
3.3 Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) per la determinazione dei tioli	21
3.4 Preparazione degli organi per l'analisi dei tioli tramite HPLC	22
3.5 Validazione del metodo HPLC per la determinazione dei tioli negli organi di topo	22
3.6 Colture cellulari di cellule RAW 264.7 e preparazione dei campioni per la determinazione dei tioli.....	23
3.7 Dosaggio delle proteine allo spettrofotometro.....	24
3.8 Infezione da LP-BM5, trattamento e sacrificio degli animali.....	24
3.9 Dosaggio delle immunoglobuline G (IgG) ed immunoglobuline E (IgE) in plasma di topi C57BL/6.....	24
3.10 Determinazione di citochine Th1/Th2 in surnatanti di splenociti ottenuti da milze di topi.	25
3.11 Purificazione di RNA, sintesi del DNA e real-time PCR	25
3.12 Isolamento e coltura di macrofagi peritoneali murini	26
3.13 Quantificazione del DNA BM5d in milza, linfonodi e macrofagi peritoneali.....	26
3.14 Valutazione della capacità di GSH-C4 e I-152 di aumentare il contenuto tiolico in organi di topo C57BL/6.....	27
3.15 Infezione con il virus dell'influenza, trattamento e sacrificio degli animali	27
3.16 Recupero del lavaggio bronco-alveolare di topi BALB/c	27
3.17 Determinazione di citochine Th1/Th2 nel fluido broncoalveolare di topi BALB/c	28
3.18 Titolo virale nei polmoni di topi BALB/c	28
3.19 Dosaggio delle immunoglobuline IgG1 ed IgG2a in plasma di topi BALB/c.....	28
3.20 Studio statistico	29
4. RISULTATI	30
4.1 Validazione di un metodo HPLC per la determinazione simultanea del glutatione ridotto e della cisteina	30
Selettività.....	30
Linearità ed LLOQ	30
Stabilità del campione	32
Precisione, accuratezza e recovery	32

4.2 Studio della capacità dell'I-152 e del GSH-C4 di ripristinare il contenuto tiolico in cellule RAW 264.7 in seguito a deplezione del GSH	34
Capacità di I-152 di ripristinare il contenuto tiolico in cellule RAW 264.7	34
Capacità del GSH-C4 di ripristinare il contenuto tiolico in cellule RAW 264.7	37
4.3 Studio della risposta immunitaria e dello stato redox in topi infettati con il complesso retrovirale LP-BM5	39
Valutazione della progressione dell'infezione da LP-BM5	39
Valutazione della risposta immunitaria Th1/Th2	40
Contenuto tiolico in organi di topi infettati con LP-BM5	43
Contenuto tiolico e livelli di espressione dell'mRNA di IL-12 p40 in macrofagi peritoneali murini infettati con il complesso retrovirale LP-BM5	45
4.4 Capacità di I-152 e GSH-C4 di aumentare il contenuto tiolico in milza, linfonodi, pancreas e cervello di topi C57BL/6	47
Contenuto tiolico in plasma e organi di topi C57BL/6 trattati con I-152	47
Contenuto tiolico in plasma e organi di topi C57BL/6 trattati con GSH-C4	50
4.5 Modulazione della risposta immunitaria in topi infettati con il complesso retrovirale LP-BM5 e trattati con I-152 o GSH-C4	53
Splenomegalia, linfadenopatia e DNA BM5d	53
Livelli di citochine Th1/Th2 in topi infettati con il complesso retrovirale LP-BM5 e trattati con I-152 o GSH-C4	55
4.6 Studio dello stato redox intraorgano in topi BALB/c giovani ed anziani	58
Contenuto tiolico intraorgano in topi BALB/c giovani ed anziani	58
4.7 Modulazione della risposta immunitaria in topi infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati con il GSH-C4	59
Replicazione virale nei polmoni di topi anziani infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati con il GSH-C4	59
Livelli di citochine Th1/Th2 in topi infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati con il GSH-C4	60
IgG1 e IgG2a nel plasma di topi infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati con il GSH-C4	61
5. DISCUSSIONE	62
6. BIBLIOGRAFIA	69

1. INTRODUZIONE

1.1 Il glutathione ridotto

Il glutathione ridotto (GSH) (Figura 1) è il principale composto tiolico non proteico presente nelle cellule animali. È composto da tre aminoacidi [cisteina (Cys), acido glutammico e glicina]) e viene sintetizzato *de novo* in due “steps” enzimatici. Nel primo “step” il gruppo γ -carbossilico del glutammato viene attivato dall’ATP, per formare un acil fosfato come intermedio, che viene poi attaccato dall’ α -ammino gruppo della Cys, dando γ -glutamylcisteina. Questa reazione, catalizzata dall’enzima γ -glutamylcisteina ligasi (GCL), è il fattore limitante della sintesi del GSH [1] e porta alla formazione di un legame γ -peptidico atipico, in quanto porta ad unire i due aminoacidi attraverso il gruppo γ -carbossilico invece che al gruppo α -carbossilico del glutammato. Questa disposizione insolita è soggetta a idrolisi da parte di un solo enzima noto, la γ -glutamyl transpeptidasi (GGT), presente solo sulle superfici esterne di alcuni tipi di cellule. Il secondo “step” è una reazione di condensazione, nella quale il gruppo α -carbossilico della Cys viene attivato ad acil fosfato, per permettere la reazione con la glicina tramite l’enzima glutathione sintetasi (GS) [2].

Le funzioni del GSH sono molteplici.

- È l’agente riducente della glutaredossina nella sintesi dei deossiribonucleotidi.
- Contribuisce a mantenere i gruppi sulfidrilici delle proteine allo stato ridotto e il ferro del gruppo eme allo stato ferroso (Fe^{2+}).
- È il metabolita chiave per le vie di detossificazione dipendenti dal citocromo P450 che è giornalmente messo alla prova non solo dall’assunzione di farmaci, ma anche da prodotti di inquinamento (tossine ambientali) come i metalli pesanti o più banalmente i prodotti di derivazione del fumo di sigaretta e derivati dalla combustione di carburante.
- È coinvolto nella disintossicazione dagli xenobiotici e dei loro metaboliti. Queste sostanze sono elettrofile o elettrone-attrattori e formano coniugati con il GSH in maniera spontanea o enzimaticamente, durante reazioni catalizzate dalla glutathione-S-transferasi (GST). I coniugati formati sono solitamente escreti dalla cellula e introdotti nella bile.
- Ha un’azione immunitaria, ossia i linfociti, in particolare quelli appartenenti ai sottotipi T, hanno un’elevata domanda di GSH per poter espletare regolarmente la loro attività e per replicarsi. La deplezione di GSH durante un processo infiammatorio acuto o cronico o durante un’infezione condurrà ad una risposta immunitaria meno efficace; quest’ultima azione è fortemente collegata con la sua capacità antiossidante, infatti l’accumulo di radicali liberi all’interno dei linfociti durante una risposta infiammatoria fa sì che questi siano meno efficaci. Il compito

del GSH è quello di eliminare i composti tossici presenti all'interno delle cellule e questo avviene riducendo il composto [3]. Più avanti sarà inoltre ampiamente discusso il coinvolgimento del GSH su un altro aspetto della risposta immunitaria.

- È un deposito della Cys, poiché questo amminoacido risulta estremamente instabile in ambiente extracellulare e si auto-ossida rapidamente a cistina, in un processo che produce ossigeno e radicali liberi. Questa funzione si esplica mediante il ciclo del γ -glutamyl, descritto per la prima volta nel 1970 da Orlowski e Meister, che utilizza il GSH come fonte continua di Cys [4].

Quindi il GSH è il principale antiossidante naturale presente all'interno delle nostre cellule e gioca un ruolo cruciale nel normale bilancio tra lo stato ossidato e quello ridotto della cellula; ciò permette, come visto, l'adeguata regolazione di molte funzioni vitali della cellula come la sintesi e la riparazione del DNA, la sintesi delle proteine e l'attivazione e la regolazione degli enzimi.

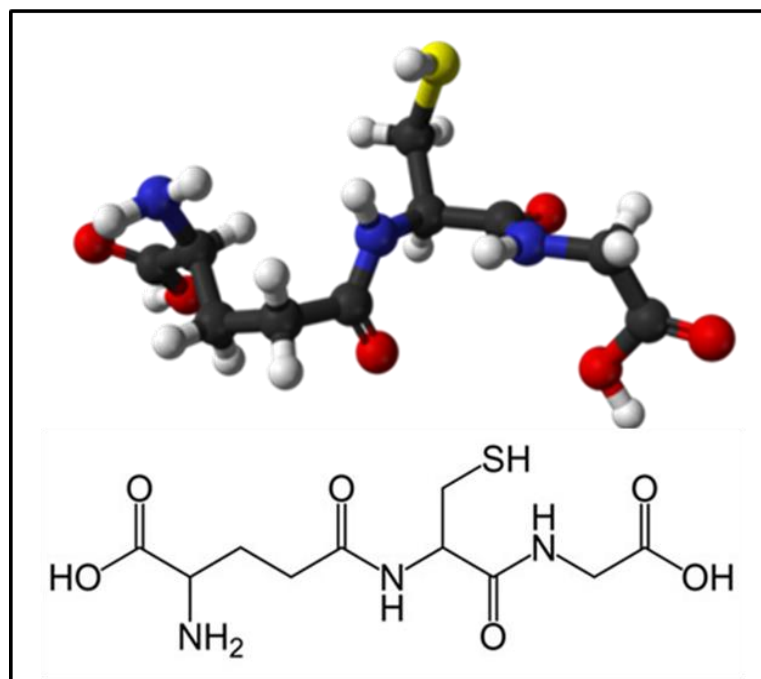


Figura 1. Modello *Ball-and-Stick* (sopra) e struttura (sotto) della molecola glutatione ($C_{10}H_{17}N_3O_6S$).

I suoi equivalenti riducenti possono essere utilizzati anche per rimuovere i perossidi tossici che si formano nel corso della crescita e durante il metabolismo in condizioni aerobiche: $2\text{GSH} + \text{R-O-O-H} \rightarrow \text{GSSG} + \text{H}_2\text{O} + \text{R-OH}$. La forma ossidata del GSH (GSSG), prodotta durante la sua attività ossidoreduttiva, contiene due molecole di GSH unite da un ponte disolfuro. La reazione è catalizzata dalla glutatione perossidasi (GP), un enzima che contiene un atomo di selenio legato covalentemente in forma di selenocisteina. Il selenio è essenziale per l'attività catalitica dell'enzima mentre gli atomi di zolfo dell'aminoacido Cys sono

responsabili dell'attività biologica del GSH, e il rapporto tra il GSH e il GSSG è un indicatore della capacità antiossidante della cellula [3, 5].

Il GSH è anche substrato della GSH-deidrogenasi che rigenera molecole antiossidanti come l'acido ascorbico e della GST che detossifica composti esogeni ed endogeni [5].

1.2 Il GSH in condizioni patologiche

Data la sua importanza in numerosi processi metabolici e di protezione cellulare, è facile intuire come la carenza di GSH, che si manifesta in gran parte attraverso un aumento della suscettibilità allo stress ossidativo, possa essere associata all'insorgenza e alla progressione di una moltitudine di patologie. Viceversa, come viene osservato generalmente in molti tipi di cellule tumorali, elevati livelli di GSH aumentano la capacità antiossidante e la resistenza allo stress ossidativo [6].

Le patologie causate da carenza di GSH colpiscono soprattutto soggetti con deficit congeniti di enzimi, specifici per il suo metabolismo. Ad esempio, soggetti con deficit di GS mostrano anemia emolitica, acidosi metabolica, infezioni batteriche e progressiva disfunzione del sistema nervoso centrale [6]. L'anemia emolitica e i sintomi neurologici sono stati osservati anche in pazienti con carenza di GCL. Inoltre, negli esseri umani, la deficienza ereditaria degli enzimi del ciclo γ -glutamyl porta ad una ridotta produzione di GSH, rendendo le cellule particolarmente vulnerabili allo stress ossidativo e favorendo i processi apoptotici e necrotici. Il danno che ne risulta è il passo fondamentale per l'insorgenza e la progressione di molti stati di malattia in quanto ridotti livelli di GSH hanno dimostrato di essere una caratteristica di una vasta gamma di patologie, tra cui le malattie neurodegenerative, la fibrosi cistica, e diverse infezioni virali [6, 7].

Livelli ridotti di GSH sono una caratteristica comune nelle patologie neurodegenerative, in quanto una vasta gamma di disfunzioni del Sistema Nervoso Centrale (SNC) sono state ricondotte ad errori congeniti del metabolismo del GSH, suggerendo che il cervello è particolarmente sensibile alle alterazioni della sua omeostasi. Questo tripeptide infatti ha un ruolo fondamentale nella protezione del cervello dallo stress ossidativo, agendo come inibitore della perossidazione lipidica ed eliminando i radicali liberi come le specie reattive dell'ossigeno prodotte continuamente durante il metabolismo ossidativo e generate in tassi elevati in quest'organo [8]. A causa di ciò, il cervello è molto più vulnerabile al danno ossidativo rispetto agli altri tessuti e un'alterazione dei livelli di GSH con conseguente stress ossidativo è un importante meccanismo patogenetico proposto per malattie neurodegenerative tra cui il morbo di Parkinson e il morbo di Alzheimer. Analisi del tessuto celebrale post-mortem di pazienti con il Parkinson hanno evidenziato uno squilibrio del rapporto GSH/GSSG dovuto ad una diminuzione dei livelli di GSH nella substantia nigra rispetto ai controlli [9]. Inoltre una down-regolazione della sintesi del GSH nel cervello di ratto ha dimostrato essere la causa di una progressiva degenerazione dei neuroni

dopaminergici presenti nella substantia nigra [10], degenerazione che è nota essere responsabile dei caratteristici sintomi motori del morbo [11].

Recenti evidenze sperimentali hanno invece dimostrato che in neuroni simili a quelli di pazienti di Alzheimer provenienti da topi transgenici, si riscontravano livelli di GSH più bassi rispetto ai controlli e che tale deplezione era più importante dell'aumento dei ROS nel causare un aumento della morte neuronale [12].

Una carenza sistemica del GSH che progredisce nel tempo è stata descritta anche nella fibrosi cistica [13], una malattia genetica caratterizzata da una disfunzione polmonare grave, causata da una modificazione di una proteina di trasporto degli ioni Cl⁻, la proteina regolatrice della conduttanza transmembrana della fibrosi cistica (CFTR). Questa proteina è importante nel mantenere l'equilibrio cellulare degli ioni e facilita l'esportazione transmembrana del GSH [14], il quale funge da antiossidante essenziale per proteggere il tessuto polmonare dalle tossine inalate e dagli attacchi ossidativi dovuti all'inalazione dell'ossigeno puro e al rilascio dei ROS da parte dei fagociti polmonari. I pazienti affetti da fibrosi cistica presentano livelli bassi di GSH nel plasma e nel liquido polmonare delle cellule di rivestimento epiteliale [13, 15]. Tale carenza è stata associata ad un aumento del fattore di trascrizione NF-κB [15], coinvolto nella regolazione di citochine infiammatorie, ad un conseguente aumento dell'infiammazione, segno distintivo della fibrosi cistica e ad un elevato stress ossidativo causa di danni alle membrane cellulari così come delle proteine e DNA cellulari. A sostegno dell'influenza determinante dei ROS nella fibrosi cistica, questi pazienti hanno spesso livelli più elevati di perossidazione lipidica [16].

Altra patologia caratterizzata da uno squilibrio dello stato redox è la pancreatite acuta, contraddistinta da una deplezione del GSH nelle fasi iniziali [17, 18]. In modelli animali aventi tale patologia il pre-trattamento con il glutatione monoetil estere ha apportato effetti benefici incrementando i livelli di GSH pancreatici [18], mentre l'inibizione della sintesi del tripeptide tramite la butionina sulfossimina (BSO) ha portato ad un aumento della necrosi pancreatica ed ad una ridotta sopravvivenza [19].

Numerose patologie a carico dell'apparato cardiocircolatorio sono da ricondursi ad uno squilibrio dell'omeostasi del GSH e ad errori nel suo metabolismo [6]. Infatti, polimorfismi degli enzimi GP e GST sono associati ad un aumentato rischio di incorrere in malattie cardiovascolari a causa dell'accumulo di specie reattive dell'ossigeno. In particolare, i polimorfismi riguardanti la GP sembrano aumentare il rischio di sviluppare malattia coronarica, ictus e trombosi cerebrale, mentre quelli a carico della GST sono associati all'aumento dei markers infiammatori e delle malattie coronariche, specialmente nei fumatori [20]. Ulteriori studi hanno rafforzato il legame tra il GSH e le condizioni cardiovascolari come l'ipertensione, il cui sviluppo è strettamente correlato all'aumento dei ROS [21] o l'aterosclerosi in cui è stato dimostrato che la somministrazione liposomiale del tripeptide in un modello murino della patologia diminuiva lo stress ossidativo nel plasma e nei macrofagi [22].

Il glutatione gioca un ruolo importante anche in vari tipi di cancro. Infatti, mentre una carenza del GSH, o una diminuzione del rapporto GSH/GSSG, porta ad un incremento della

suscettibilità allo stress ossidativo implicato nella progressione del cancro, livelli elevati di GSH aumentano la capacità antiossidante e la resistenza allo stress ossidativo come osservato in tante cellule tumorali [23]. È ormai ben noto che le specie reattive dell'ossigeno e i prodotti chimici elettrofili possono danneggiare il DNA e che il GSH può proteggere contro questo tipo di danno e può direttamente disintossicare la cellula da sostanze cancerogene [6]; d'altra parte i livelli elevati del tripeptide che si sono osservati in vari tipi di cellule cancerose e tumori solidi donano a queste cellule una maggiore resistenza alla chemioterapia [24, 25]. In molte cellule normali e maligne, un aumentato livello del tripeptide è associato ad una risposta proliferativa ed è essenziale per la progressione del ciclo cellulare [26, 27]. In cellule del cancro al fegato e di melanoma metastatico, il GSH è stato correlato con la crescita cellulare [28, 29], inoltre è stato dimostrato che esiste un diretto rapporto dei livelli di GSH con la proliferazione cellulare e l'attività metastatica [28]. L'elevato contenuto di GSH è tipicamente associato, in alcune cellule tumorali, ad una maggiore attività di enzimi legati alla sintesi di questa molecola, come la GCL e la GGT [25]. Questo squilibrio nella biochimica del GSH osservata sia in tumori murini che umani [30-32], dona alle cellule tumorali una difesa contro l'aggressione del microambiente tumorale [33], una capacità colonizzante [28] e di evasione dell'apoptosi [34] e una resistenza alle radiazioni e a molti farmaci chemioterapici [25, 35].

1.3 Il GSH nelle infezioni virali

Numerosi studi hanno evidenziato come un'alterazione dell'equilibrio dello stato redox intracellulare sia presente in molteplici infezioni virali e di come giochi un ruolo fondamentale nella progressione della patologia indotta dal virus [36]. Questo squilibrio sembra sia associato con una deplezione del GSH e sebbene non ci siano dubbi sul fatto che il calo del tripeptide sia implicato in molteplici infezioni virali risulta ancora difficile affermare se tale evento sia un effetto o una causa dell'infezione stessa. Infatti, i meccanismi attraverso cui diversi tipi di virus inducono questo "imbalance" dello stato redox restano ancora poco chiari. Tuttavia, in alcuni casi, vi sono prove ragionevoli che avvalorano come lo squilibrio dello stato redox sia essenziale per l'avvio e il mantenimento della replicazione virale [37]. Evidenze sperimentali, sia *in vitro* che *in vivo*, suggeriscono che l'infezione da virus Herpes simplex di tipo 1 (HSV-1) sia la causa di una diminuzione significativa del GSH e che il deterioramento dello stato redox intracellulare è necessario per la replicazione del virus [37-39]. In infezioni *in vitro* di HSV-1 è stato dimostrato come i livelli di GSH endogeni siano drasticamente diminuiti già nelle prime 24 ore dopo l'adsorbimento [37] e di come l'aggiunta di GSH produca un'inibizione concentrazione dipendente, della replicazione virale [37, 39], evidenziando un ruolo fondamentale del tripeptide nel ciclo vitale del virus. Tale capacità dell'antiossidante sembra sostanzialmente legata all'inibizione delle ultime fasi della replicazione virale: la sintesi proteica. Tra le proteine dell'HSV-1, l'espressione della glicoproteina B è quella più influenzata dal

trattamento con il GSH il quale, probabilmente, interferisce con la formazione del dimero della proteina, inducendo la scissione dei ponti disolfuro [37].

Livelli bassi di GSH sono stati ritrovati anche nel plasma, nelle cellule mononucleate del sangue periferico e nei monociti di individui asintomatici recanti il virus dell'immunodeficienza umana (HIV) così come nei pazienti affetti da AIDS [40]. Inoltre, studi clinici hanno dimostrato che la carenza del tripeptide è correlata con la morbidità [41]. Questi risultati hanno suggerito che un generale sistema antiossidante compromesso ha un ruolo importante in tali condizioni cliniche, tuttavia la carenza del GSH è coinvolta in vari aspetti dell'HIV. È stato riportato che l'aumento dei livelli di citochine infiammatorie, causato dal virus, quali l'interleuchina (IL)-1, il fattore di necrosi tumorale (TNF)- α e l'IL-6, possa indurre sia la deplezione del GSH che il conseguente stress ossidativo [42]. Questo fenomeno, a sua volta, può attivare NF- κ B, un fattore di trascrizione noto per essere attivato in risposta a diversi tipi di stress ossidativo, e capace di legarsi ed attivare geni controllati da lunghe ripetizioni terminali (long terminal repeats, LTR) dell'HIV, permettendo quindi l'espressione virale [43]. È stato dimostrato inoltre che l'aumento dei livelli intracellulari di GSH può causare l'inibizione della replicazione di HIV attraverso vari meccanismi di azione. Tra questi meccanismi vi è il blocco dello stress ossidativo che ha come conseguenza la mancata attivazione di NF- κ B; l'induzione di modificazioni redox nel dominio D2 di CD4 interferendo così con l'ingresso di HIV; l'inibizione del processo di trascrittasi inversa dell'RNA genomico di HIV e l'inibizione del corretto folding e stabilizzazione della conformazione nativa delle proteine virali impedendo così la produzione di particelle virali infettive [44] (Figura 2).

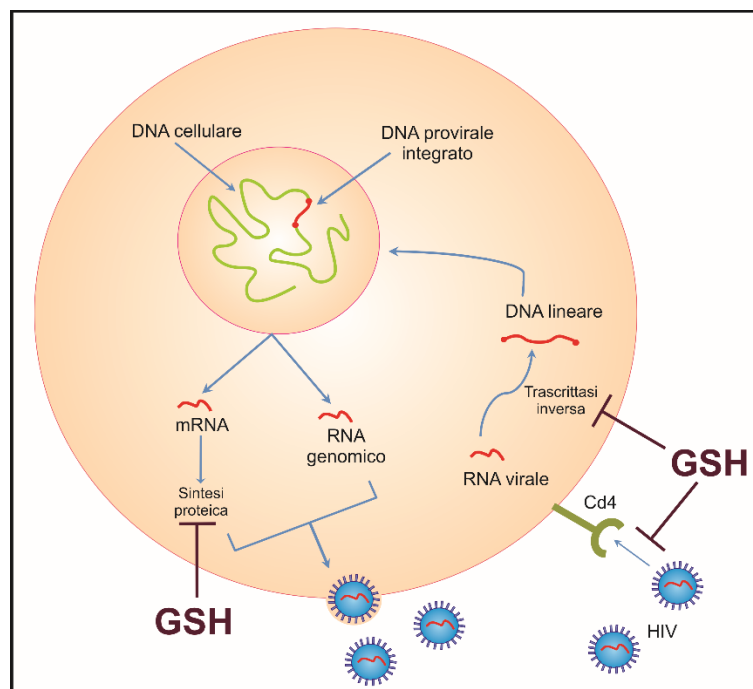


Figura 2. Inibizione da parte del GSH di differenti steps durante il ciclo vitale di HIV.

Diminuzioni rapide dei livelli di GSH sono state osservate anche in seguito ad infezioni di virus che causano effetti citopatici acuti nelle cellule epiteliali (es. Parainfluenza). In queste cellule la perdita di GSH sembra avvenire maggiormente durante l'adsorbimento del virus che causa modificazione della membrana plasmatica e fuoriuscita del tripeptide. Questo calo di GSH porta ad un malfunzionamento dell'antiporto Na^+/H^+ , con conseguente calo del pH intracellulare, che a sua volta favorisce le prime fasi della replicazione virale [45]. Nelle fasi avanzate della replicazione virale la deplezione del GSH sarebbe invece una conseguenza della preferenziale incorporazione della Cys nelle proteine virali, molto ricche di questo aminoacido [45]. Al contrario, durante un'infezione cronica, come quella causata dall'HIV nei macrofagi umani, cambiamenti significativi nei livelli di questo antiossidante si riscontrano solo quando l'infezione cronica è ben definita [46].

Altri studi hanno dimostrato che anche le singole proteine virali possono esercitare degli effetti sul contenuto del GSH. Per esempio, la proteina regolatoria Tat dell'HIV, transattivatore essenziale per la replicazione del virus secreta dalle cellule infettate, può amplificare l'attività del $\text{TNF-}\alpha$ e la conseguente replicazione virale, riducendo i livelli del tripeptide ed inibendo l'espressione e l'attività della superossido manganese dismutasi [47]. Inoltre, è stato dimostrato che la glicoproteina virale di HIV (gp120) e la proteina Tat possono indurre stress ossidativo in una linea cellulare endoteliale immortalizzata da capillari di cervello di ratto, RBE4 (modello *in vitro* della barriera emato-encefalica) [48].

Lo stress ossidativo è stato dimostrato essere implicato anche nell'epatite C (HCV) cronica [49]. Nei pazienti affetti da tale patologia, i livelli di GSH sono drasticamente ridotti in frazioni epatiche, plasmatiche e nelle cellule mononucleari del sangue periferico [50, 51]. Diverse sono le cause che sono state identificate come i fattori che contribuiscono al danno ossidativo. Alcuni autori hanno dimostrato che la proteina del core dell'HCV, ha importanti effetti mitocondriali provocando un'ossidazione del glutatione, un difetto nel trasporto degli elettroni mediato dal complesso 1 e un aumento della produzione dei ROS [52]. È stato inoltre dimostrato che lo stress ossidativo indotto da HCV nel fegato può rendere gli epatociti suscettibili al danno del DNA, il cui accumulo può portare a trasformazioni maligne [53].

Un altro virus che induce uno squilibrio nello stato redox intracellulare verso uno stato pro-ossidante è quello dell'influenza A. Infatti, una diminuzione dei livelli intracellulari di GSH e uno stress ossidativo generale sono stati dimostrati anche durante l'infezione causata dal virus influenzale sia in modelli *in vitro* che *in vivo* [54, 55]. È stato infatti dimostrato che durante la replicazione del virus dell'influenza diminuiscono i livelli del GSH e che quest'ultimo è un importante modulatore del ciclo vitale di tale virus [54].

1.4 Il GSH e l'invecchiamento

Oltre alle malattie neurodegenerative discusse sopra, la carenza di GSH risulta essere associata a numerose patologie correlate all'invecchiamento [56], in quanto con il passare dell'età si assiste ad un progressivo e graduale abbassamento dei livelli di GSH e delle difese

antiossidanti in generale, nonché ad una diminuzione della capacità di tali sistemi di essere indotti da stimoli esogeni [57, 58]. Questo declino è associato ad una maggiore incidenza di malattie croniche legate all'età [59].

Il processo di invecchiamento coinvolge vari cambiamenti morfologici e biochimici rendendo l'organismo più vulnerabile alle malattie e anche se i meccanismi esatti di questi eventi non sono ancora del tutto noti, una diminuita attività di GCL, GS [60] e della glutathione reduttasi [61] sono considerati dei fattori importanti. È stato proposto che con l'invecchiamento si ha un aumento della formazione e rilascio di ROS, un aumento dell'ossidazione proteica, una riduzione della funzione mitocondriale ed un aumento del danno al DNA [62].

Un aumento dei prodotti della perossidazione lipidica in cervello di ratto, dovuto all'invecchiamento, ha confermato il coinvolgimento dello stress ossidativo in modelli animali [63]. Il declino del GSH è stato associato al peggioramento cronico dell'udito, dovuto all'accumulo di radicali liberi ed al peggioramento della vista, che porta a numerosi disordini come degenerazione maculare, cataratta e glaucoma [57]. Inoltre, lo stress ossidativo prodotto dai radicali liberi è coinvolto nella patogenesi dell'osteoporosi post-menopausale, in quanto favorisce l'attività osteoclastica a discapito di quella osteoblastica, portando così ad una perdita di massa ossea e al deterioramento della micro-architettura delle ossa, che risulta in un declino delle competenze biomeccaniche e in un aumento del rischio di fratture [64].

1.5 Le interleuchine e il differenziamento dei linfociti Th

Le interleuchine (IL) sono un insieme di proteine prodotte e secrete da una grande varietà di cellule, fondamentalmente appartenenti al sistema immunitario, come risposta ad uno stimolo immunologico o come segnale intercellulare dopo lo stimolo di una di esse. Presentano una grande varietà di funzioni e sono in grado di modificare il comportamento delle cellule, inducendo attività come crescita, differenziamento e morte ma soprattutto sono di grande importanza nel modulare la risposta immunitaria, sia naturale od innata che acquisita. Esse agiscono fondamentalmente in forma locale, sia sulla stessa cellula che le produce (attività autocrina) sia sulle cellule vicine (attività paracrina), ma in alcuni casi mediante diffusione attraverso il sangue possono agire su cellule bersaglio distanti (attività endocrina) manifestando quindi la loro azione su tutto l'organismo [65].

Alcune delle interleuchine secrete dai macrofagi sono tra i più importanti stimoli in grado di guidare il differenziamento dei linfociti T CD4⁺ verso i distinti profili. Infatti, i linfociti T helper (CD4⁺) possono differenziarsi in sottopopolazioni che, a loro volta, producono un diverso spettro di interleuchine, in grado di svolgere funzioni effettrici differenti.

Le principali sottopopolazioni di linfociti T helper (Th) sono le cellule Th1 e le cellule Th2. Recentemente è stata identificata un'altra sottopopolazione, i Th17 in grado di secernere l'IL-17 [66].

Il destino funzionale di una cellula T CD4 *naive* viene determinato nelle fasi iniziali della risposta all'antigene, caratterizzate da meccanismi molteplici e non ancora del tutto chiariti. Certamente però le interleuchine presenti nel microambiente linfatico in cui avviene il primo incontro con l'antigene svolgono un ruolo essenziale.

Se una cellula T CD4⁺ incontra l'antigene in presenza di IL-12 e/o IL-27, essa diverrà preferenzialmente una cellula effettrice Th1, mentre sarà contestualmente inibita la sua differenziazione in cellula Th2. Precisamente l'IL-12 è una citochina pro-infiammatoria che ha un ruolo fondamentale nel mantenere *in vivo* l'equilibrio tra le risposte Th1 e Th2, in particolare essa stimola la produzione di interferone (IFN)- γ e favorisce il differenziamento delle cellule Th0 in Th1 [67].

Dal momento che generalmente l'IL-12 e l'IL-27 sono prodotte principalmente dalle cellule presentanti l'antigene (APC), quali macrofagi e cellule dendritiche nelle prime fasi della risposta a patogeni intracellulari, si può comprendere perché le risposte adottate verso tali patogeni siano dominate da meccanismi effettori messi in atto da cellule T CD4⁺ di tipo Th1 secernenti INF- γ ed IL-2. In direzione opposta, uno stimolo antigenico che avvenga in assenza delle citochine sopra citate consente alla cellula T *naive* di produrre in maniera autocrina l'IL-4 e di differenziarsi in una cellula Th2, secernente a sua volta oltre che l'IL-4, anche l'IL-10, l'IL-5 e l'IL-6. L'IL-4 promuove dunque il differenziamento in senso Th2 e si verifica in risposta agli elminti e agli allergeni, che provocano una stimolazione cronica dei linfociti T, spesso con scarsa attivazione macrofagica. L'IL-4 e l'IL-10 peraltro svolgono un'azione inibitoria sulla differenziazione in Th1, consentendo una polarizzazione della risposta in senso Th2. In sostanza, ognuna delle due sottopopolazioni si auto-amplifica, e in presenza di un eccesso di una classe di citochine, una componente della risposta immunitaria risulta inibita, portando ad un sbilanciamento dell'equilibrio Th1/Th2 [67-71].

La capacità delle due popolazioni linfocitarie, Th1 e Th2, di esprimere un diverso profilo citochinico implica l'espressione di funzioni diverse.

Le cellule Th1 sono in grado di attivare in modo massimale i monociti/macrofagi coinvolgendoli nei cosiddetti "fenomeni di ipersensibilità ritardata", inoltre tali cellule inducono i macrofagi ad un'attività pro-coagulante ed ad una produzione di fattore tissutale in grado di iniziare nel microambiente capillare la cascata coagulativa. Quindi, la principale funzione effettrice svolta dalle cellule Th1 è la difesa mediata da fagociti, in particolare nei confronti di infezioni da microrganismi intracellulari. L'IFN- γ prodotto dalle cellule Th1 stimola l'attività antimicrobica dei fagociti, favorendo così l'eliminazione intracellulare dei patogeni; parallelamente, esso stimola anche la produzione di anticorpi (delle classi IgG2a e IgG2b), capaci di opsonizzare i batteri e di attivare il complemento, due meccanismi che a loro volta contribuiscono a promuovere la fagocitosi. In aggiunta, l'IL-12 funge da fattore di crescita autocrina, ed insieme

all'IFN- γ stimola il differenziamento e la proliferazione dei linfociti T citotossici (CD8⁺) capaci di sopprimere cellule infettate da batteri e virus e da patogeni intracellulari, eradicando così l'infezione [67, 68, 72].

La principale funzione effettrice svolta dalle cellule Th2 è invece un'attività di supporto alla sintesi dell'immunoglobuline (Ig), inducendo soprattutto risposte di classe IgE. I Th2 sono inoltre in grado di interagire con mastociti e granulociti eosinofili, ne guidano la maturazione, la differenziazione e l'attivazione, supportandone peraltro una prolungata sopravvivenza. Tali reazioni sono indotte dall' IL-4, l'IL-5 e l'IL-13. Le cellule Th2 sono deputate alla difesa nei confronti delle infezioni da elminti e da artropodi, e sono inoltre responsabili dello sviluppo di reazioni allergiche. Gli isotipi anticorpali (IgG1 and IgG3) prodotti per azione delle interleuchine Th2 non favoriscono la fagocitosi né attivano efficacemente il complemento; inoltre, molte interleuchine secrete dalle cellule Th2 in particolare l'IL-4, l'IL-13 e l'IL-10, assieme all'azione di altri tipi cellulari, antagonizzano la funzione dell'IFN- γ , inibendo così l'attivazione macrofagica. Per di più, una polarizzazione in senso Th2 può verificarsi nelle fasi più tardive della risposta immune e le interleuchine prodotte dalle cellule Th2 hanno in questo caso l'effetto di limitare l'eventuale danno tissutale causato dalla risposta cellulo-mediata [67, 68, 72].

1.6 Il ruolo del GSH sullo sviluppo di una risposta Th1 o Th2

Molti fattori influenzano lo sviluppo di una risposta Th1 o Th2 con relativa secrezione di citochine ad esse associate, ma il legame tra la presenza del GSH ed il sistema immunitario è stato appurato in vari studi [73-76].

Il ruolo delle citochine e l'insorgenza di una delle due risposte è risultato importante in varie patologie come infezioni virali, disturbi allergici e AIDS; tutte queste patologie sono caratterizzate dalla deplezione del GSH nelle APC e dal fallimento della risposta Th1. Studi *in vitro* ed *in vivo* dimostrano che una deplezione di GSH in queste cellule è correlata con un'incapacità di tali cellule di ridurre i legami disolfuro dell'antigene e con una diminuita attività delle proteasi causando una difettosa elaborazione dell'antigene stesso ed una ridotta produzione di citochine associate di tipo Th1 [73-79] (Figura 3).

Nei macrofagi murini la deplezione di GSH è causa di una riduzione di secrezione dell'IL-12 con conseguente passaggio da un tipico profilo di citochine Th1 a modelli di risposta Th2 [80]. Anche nei macrofagi alveolari umani i livelli di GSH svolgono un ruolo fondamentale nel determinare lo sviluppo di una risposta o dell'altra [81]. In cellule dendritiche, le molecole in grado di incrementare o diminuire il contenuto intracellulare di GSH sono in grado rispettivamente di aumentare o di ridurre la produzione di IL-27 [82]. Pertanto l'espressione sia dell'IL-12 che dell'IL-27 sembra essere influenzata dallo stato redox dell'APC.

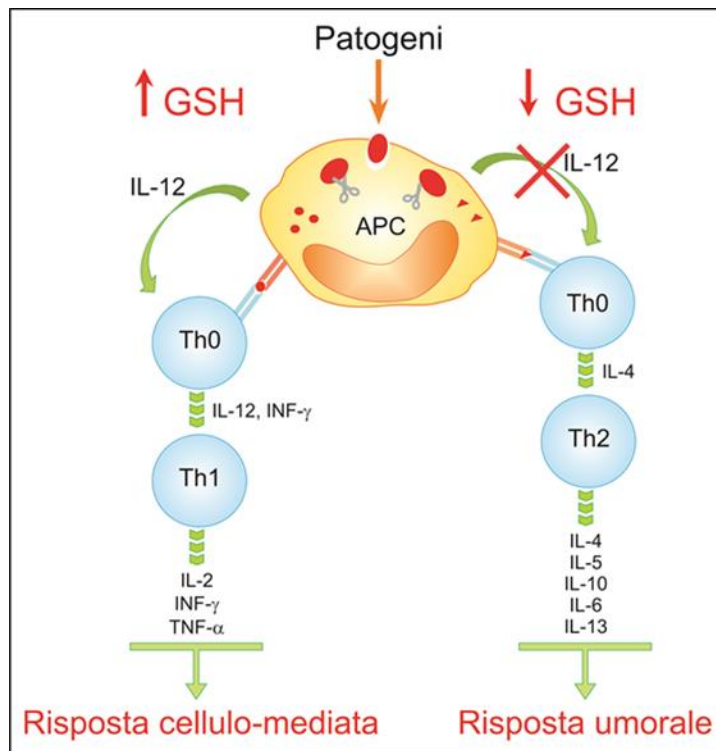


Figura 3. Ruolo del GSH nelle APC sullo sviluppo della risposta immunitaria Th1 o Th2.

È stato dimostrato inoltre che il GSH agisce sulle cellule T aumentando la sintesi e il turnover dei recettori dell'IL-2, così come la produzione e la proliferazione della stessa interleuchina [83]. Inoltre, numerosi studi aventi lo scopo di modulare la produzione di interleuchine, hanno dimostrato che la reintegrazione di GSH ripristina sia le risposte delle cellule T inibite che la secrezione dell'IL-2 da parte delle stesse cellule T [84]. Il GSH può anche down-regolare l'espressione del recettore CD30, che è espresso sulle cellule linfoidi attivate, in particolare sulle cellule T e B del sangue periferico [85]. Questo aspetto è particolarmente interessante perché una maggiore espressione di tale recettore sembra avere un ruolo in malattie caratterizzate da un aumento dei livelli di linfociti di tipo Th2, come l'AIDS [86], la dermatite atopica [87], la sclerosi sistemica [88] e il lupus eritematoso sistemico [89].

1.7 Le molecole pro-GSH

Il coinvolgimento del GSH in molteplici condizioni patologiche caratterizzate anche da uno squilibrio della risposta immunitaria ha stimolato numerosi ricercatori a cercare nuovi potenziali approcci per mantenere o ripristinare i livelli di GSH. Questo tripeptide potrebbe essere utilizzato innanzitutto per ripristinare il corretto stato redox in tutte quelle disfunzioni contraddistinte da una sua carenza. Il conseguente ripristino o aumento dei suoi livelli intracellulari potrebbe essere utile al fine di ristabilire un'equilibrata risposta Th1/Th2

in quelle condizioni in cui la predominanza della Th2 costituisce un importante aspetto della patologia.

L'utilizzo del GSH come agente terapeutico è limitato però dalle sue proprietà biochimiche e farmacocinetiche sfavorevoli. Infatti, per poter avere livelli terapeutici è necessaria la somministrazione di alte dosi dell'antiossidante a causa della sua breve emivita plasmatica. Inoltre, il GSH come tale non può attraversare la membrana cellulare, ha bisogno prima di essere scisso nei tre aminoacidi che lo compongono e successivamente risintetizzato nella cellula dall'azione della GCL e GS [7]. Per superare i problemi legati all'uso del GSH come agente terapeutico, molti ricercatori hanno proposto di utilizzare nuove molecole, in grado di esercitare effetti comparabili o addirittura superiori a quelli del tripeptide.

Tali molecole possono essere costituite dal GSH recante un gruppo idrofobico che facilita il passaggio attraverso la membrana cellulare (derivati mono e dietil esteri del GSH e GSH legato a catene alifatiche di diversa lunghezza) o da molecole in grado di fornire gruppi tiolici utilizzabili per la sintesi del GSH (Cys e N-acetil-cisteina, di-tioli come l'acido lipoico, "pro-tioli" come L-2-oxotiazolidine acido-4-carbossilico).

L'integrazione diretta del tripeptide a partire dai suoi derivati esteri è una strategia utile perché può eludere la richiesta di ATP e bypassare lo step della GS nella sintesi *de novo* di GSH. I derivati monoetil esteri e isopropil esteri, in cui il gruppo carbossilico del residuo di glicina è esterificato, sono più lipofili del GSH e quindi possono attraversare più facilmente la membrana aumentando rapidamente i livelli intracellulari di GSH. Questi pro-farmaci risultano più efficaci nell'aumentare l'antiossidante intracellulare in linfociti, fibroblasti e cellule endoteliali umane e in epatociti di ratto *in vitro* [90-92]. Il derivato mono estere ha dimostrato invece esser capace di aumentare significativamente il contenuto di GSH in cellule neuronali, in seguito alla sua iniezione a livello celebrale, al contrario del semplice GSH che risulta inefficace [93]. Inoltre, ulteriori studi *in vivo* condotti in topi, hanno dimostrato che tale molecola svolge un ruolo importante nella difesa cellulare contro i danni provocati dai lipidi perossidati, in quanto aumenta la capacità antiossidante epatica, incrementa la funzione mitocondriale [94] e protegge dal danno da riperfusione, migliorando la funzione cellulare e disintossicando i vasi sanguigni dai ROS che vengono generati [95].

Per quanto concerne il derivato estere isopropilico del GSH, è stato dimostrato rendere le cellule più resistenti al tert-butil idroperossido, responsabile dello stress ossidativo che accelera la perossidazione lipidica delle cellule della mucosa gastrica in coltura [96]. Inoltre, protegge contro i danni da ischemia, ipossia e iperglicemia nel cervello di ratto [97, 98].

Un altro approccio per ricostituire le riserve di GSH intracellulare consiste nell'utilizzo di pro-farmaci S-acile del GSH, che sono in grado di attraversare la membrana cellulare e possono essere riconosciuti come substrato dalla GGT. In particolare, il derivato S-acetil del GSH risulta essere molto più stabile nel plasma rispetto allo stesso GSH, è in grado di entrare direttamente nelle cellule dove viene convertito in GSH dalle abbondanti tioesterasi citoplasmatiche ed è stato dimostrato essere molto efficace nel ripristinare il GSH nelle cellule infettate da HSV-1 [39].

Un altro pro-farmaco, studiato come agente protettivo contro l'epatotossicità indotta dagli xenobiotici, è il disolfuro misto L-cisteina-glutatione. In questa molecola i gruppi tiolici reattivi

del GSH e della Cys sono mascherati da un legame disolfuro e sebbene il meccanismo non è ancora del tutto chiarito, le sue funzioni protettive sono notevoli in quanto, non solo rilascia GSH, ma anche la Cys, l'amminoacido chiave per la biosintesi de novo di altre molecole del tripeptide [99].

In condizioni fisiologiche, la disponibilità cellulare di Cys è considerata un fattore limitante nella sintesi del GSH. Tuttavia, non può essere somministrata come tale perché risulta tossica ad alte concentrazioni e si ossida facilmente formando cistina, un composto meno solubile, rendendo più difficoltosa la preparazione di una formulazione stabile [7].

L'N-acetilcisteina (NAC) è il più semplice pro-farmaco a base di Cys descritto come un'eccellente fonte di gruppi sulfidrilici capace di incrementare il GSH intracellulare. Viene utilizzata come agente chemioprotettivo in pazienti con cancro ai polmoni o alla laringe, ed è abitualmente usata per superare lo stress ossidativo, altrimenti letale, causato da overdose di paracetamolo [84]. Inoltre, esercita significativi effetti antivirali. Diversi studi hanno infatti dimostrato che la NAC inibisce l'espressione di HIV in cellule monocitiche infettate cronicamente [100], inibisce l'apoptosi indotta dall'infezione di HSV [101] e diminuisce significativamente la mortalità di topi in un modello murino di influenza [102]. Inoltre è stata segnalata per avere effetti benefici nel trattamento di malattie associate alla carenza di GSH, tra cui varie patologie neurodegenerative legate all'età, fibrosi cistica e diabete [103]. Il suo utilizzo, però, è stato limitato da diversi inconvenienti, tra cui la bassa penetrazione attraverso la membrana cellulare e la bassa biodisponibilità sistemica [104]. Per di più, è stato dimostrato che la NAC può rivelarsi una molecola dall'azione controversa, in quanto il suo effetto varia a seconda della concentrazione che se ne usa e dello stato redox preesistente nelle cellule. In colture cellulari ci sono evidenze che dimostrano come questa molecola a basse concentrazioni agisca come antiossidante mentre a concentrazioni più elevate, si rivela essere un pro-ossidante [105]. Ulteriori studi *in vivo* sembrano avvalorare tali considerazioni. Infatti, basse dosi di NAC sembrerebbero proteggere i topi dall'effetto delle endotossine, dovuto allo stress ossidativo, mentre dosi più elevate hanno aumentato la loro mortalità [106]. Inoltre, è stato dimostrato che la somministrazione di NAC ad alte dosi agisce come pro-ossidante anche nel caso di soggetti umani sani, diminuendo i livelli di GSH ed aumentando quelli di GSSG [107]. Wang et al. hanno poi dimostrato come sia determinante anche lo stato redox preesistente. In topi, nel caso di danno epatico, causato da abuso di etanolo, se la NAC veniva utilizzata come pre-trattamento sortiva l'effetto sperato; al contrario, se utilizzata come post-trattamento si comportava come un pro-ossidante aggravando il danno epatico [108]. In aggiunta è noto il duplice effetto di NAC su NF- κ B. Da un lato la molecola può inibire l'attivazione e la traslocazione nucleare di NF- κ B, dall'altra parte essa è un effettivo precursore della Cys, che in maniera indiretta sembra essere un inibitore del fattore di trascrizione [109]. Diversi studi *in vitro* hanno alimentato questo dibattito [110-112] e tali discrepanze confermerebbero la versatilità di NAC che si comporta in modo diverso a seconda dello stato redox pre-esistente e della concentrazione e può, inoltre, indurre diversi set di geni a seconda dello stato redox della cellula.

1.8 I-152 e GSH-C4

Da diversi anni nel Dipartimento di Scienze Biomolecolari, nel quale ho svolto il mio lavoro di dottorato, vengono studiate le capacità antivirali e immunomodulatorie di due molecole in grado di alterare lo stato redox intracellulare. Le molecole in questione sono il derivato butanoile del GSH, il GSH-C4 (Figura 4a), ed un pro-farmaco di N-acetil-cisteina (NAC) e betamercaptoetilammina (MEA), denominata I-152 (Figura 4b).

Queste molecole hanno già dimostrato di poter essere utilizzate come farmaci antivirali e al fine di modulare la risposta a diversi antigeni [113-117]. Inoltre si sono indagati i meccanismi molecolari con cui il GSH-C4 e I-152 possono influenzare la produzione di citochine Th1 [118]. In particolar modo si è studiata l'espressione dell'IL-12p40 e dell'IL-27p28 indotta dall'LPS più l'IFN- γ in macrofagi peritoneali murini pre-trattati con le molecole.

I risultati ottenuti mostrano che le due molecole esercitano effetti diversi sulla produzione delle citochine citate sopra, diversità che probabilmente può essere collegata al loro differente metabolismo cellulare. Sebbene entrambe le molecole aumentino il contenuto tiolico rispetto al livello basale, l'effetto che esse mostrano sulla produzione delle citochine Th1 è ben diverso. Il GSH-C4 sembra aumentare la produzione di IL-12p40 mentre I-152 causa un aumento di IL-27p28. Tali effetti sono accompagnati da evidenti differenze sulle vie di segnalazione controllate da NF- κ B e STAT-1/IRF-1, aventi un ruolo nella produzione di IL-12 e IL-27 rispettivamente. Il GSH-C4 potrebbe favorire il legame di NF- κ B con i geni che regolano l'espressione di IL-12p40, favorendo così l'accumulo dell'IL-12p40 nel mezzo di coltura delle cellule trattate con tale molecola. L'I-152 inibisce la degradazione di I κ B- α riducendo la conseguente traslocazione nucleare di NF- κ B e la produzione di IL-12, mentre mantiene attivo il "signalling" STAT-1/IRF-1 per periodi più lunghi rispetto ai controlli causando alti livelli di IL-27p28 [118].

I risultati avuti finora stabiliscono quindi che le due molecole modulano in modo diverso i pathways di "signalling" andando a modificare in modo differenziale lo stato redox intracellulare.

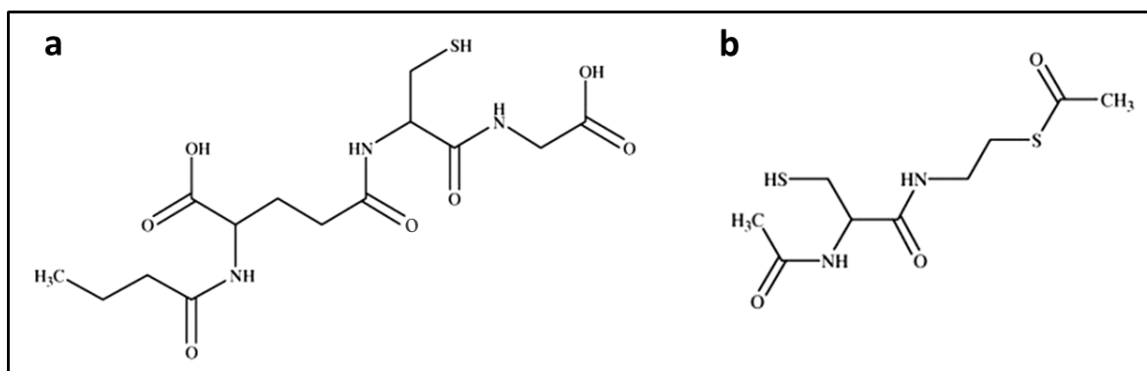


Figura 4. Struttura del derivato butanoile del GSH, il GSH-C4 (a) e dell'I-152 (b), un pro farmaco di NAC e cisteammina.

2. SCOPO DELLA TESI

In questo progetto il GSH-C4 e l'I-152 sono state utilizzate per aumentare il contenuto tiolico intracellulare e quindi favorire la risposta Th1 in topi infettati con LP-BM5. LP-BM5 è un complesso retrovirale murino responsabile di una immunodeficienza che presenta per alcuni aspetti delle analogie con lo squilibrio immunologico dell'AIDS nell'uomo [119]. In tale modello animale è stato già dimostrato che il GSH o molecole pro-GSH sono in grado di ridurre i tipici segni della malattia [117, 120, 121]. Ma, siccome in animali infettati con LP-BM5 la secrezione di citochine Th2 è aumentata mentre è ridotta quella di citochine Th1 [122], il primo obiettivo è stato quello di valutare l'eventuale correlazione tra deplezione di GSH e prevalenza della risposta di tipo Th2. Il secondo obiettivo è stato invece, quello di valutare la capacità del GSH-C4 e dell'I-152 di ripristinare il contenuto di GSH favorendo così una efficiente risposta immunitaria di tipo Th1. Quindi, preliminarmente, si è deciso di studiare la risposta immunitaria in topi infettati con LP-BM5, al fine di verificare l'effettivo "shift" Th2 confermando così i dati in letteratura, e l'eventuale deplezione di tioli in organi quali milza, linfonodi, pancreas e cervello. Tale sperimentazione ci ha inoltre permesso di mettere a punto e validare secondo le linee guida di validazione internazionale [123, 124], un nuovo metodo HPLC per l'analisi delle differenti specie tioliche negli organi.

Contemporaneamente è stata studiata *in vitro* la capacità delle due molecole di ripristinare, in seguito a deplezione di GSH, il corretto stato redox intracellulare ed *in vivo* la capacità di aumentare il contenuto tiolico in organi murini.

Successivamente, dopo aver dimostrato che l'infezione da LP-BM5 è caratterizzata da una effettiva prevalenza della risposta Th2 e da deplezione di GSH, si sono valutati gli effetti di GSH-C4 e I-152 sulla risposta immunitaria all'infezione retro virale.

Il secondo modello animale studiato era costituito da topi anziani infettati con il virus dell'influenza. Nella popolazione anziana sono stati descritti cambiamenti in tutte le componenti del sistema immunitario, noti come immunosenescenza, che portano ad un'aumentata incidenza di infezioni, cancro e malattie autoimmuni [125]. Una caratteristica dell'immunosenescenza è uno squilibrio nella risposta Th1/Th2 e lo "shift" da una risposta Th1 a una Th2 può contribuire alla ridotta risposta cellulo-mediata [126]. Lo spostamento verso la risposta Th2 e la scarsa induzione delle cellule Th1 nel sistema immunitario dell'anziano potrebbero compromettere la protezione contro molti agenti patogeni, avendo come conseguenza un'alta incidenza di infezioni [127].

Sono stati descritti diversi fattori coinvolti nelle alterazioni dell'immunità cellulo-mediata associate all'età [128-130], tuttavia partendo da tutte le evidenze riportate, si può suggerire che la deplezione di GSH nelle APC potrebbe avere un ruolo importante nel determinare lo spostamento della risposta immunitaria verso la Th2 anche nell'anziano.

Come già riportato, anche il virus dell'influenza induce uno stress ossidativo, caratterizzato da deplezione di GSH e aumento delle specie reattive dell'ossigeno, che è utile per i passaggi specifici del ciclo vitale del virus [54, 131]. Il trattamento con antiossidanti è in

grado di controllare l'infezione, e per questo è ragionevole ipotizzare che molecole pro-GSH possano interferire con la replicazione virale e aumentare il contenuto di GSH nelle cellule immunitarie, contribuendo così a potenziare l'immunità Th1. È già stato dimostrato che il trattamento con il GSH-C4 inibisce la replicazione del virus influenzale ostacolando la maturazione e il folding della glicoproteina virale emoagglutinina (HA), un processo mediato dall'attività redox sensibile della proteina disolfuro isomerasi (PDI) che si trova nel reticolo endoplasmatico[132]. In questo progetto siamo quindi andati a studiare la capacità di questa molecola di modulare la risposta immunitaria in topi vecchi infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1.

3. MATERIALI E METODI

3.1 Reagenti

Il GSH-C4 è stato acquistato presso Pepnome, (Shanghai, Cina).

L'I-152 è stata sintetizzata presso l'Istituto di Biomolecole Max Mousseron, Université Montpellier, Francia, con il quale il Dipartimento di Scienze biomolecolari ha rapporti di collaborazione da diversi anni.

La Cys, il GSH, il DTNB e il DEM (Dietilmaleato) sono stati acquistati da Sigma Aldrich (Milano, Italia), mentre l'acetonitrile è stato acquistato da Carlo Erba Reagenti (Milano, Italia).

3.2 Animali

Topi femmina C57BL/6 di quattro settimane sono stati acquistati presso Charles River (Lecco, Italia). Topi femmina di sei settimane BALB/c e topi femmina di quattro settimane ICR(CD-1) sono stati acquistati presso Harlan Nossan (Milano, Italia). Gli animali sono stati stabulati in uno stabulario avente le seguenti caratteristiche; temperatura: 22 ± 1 °C, ciclo luce/buio: 12h, umidità: $60 \pm 5\%$, ricambi d'aria: 12/h. Tutti gli animali sono stati acclimatati per una settimana prima dell'uso, tranne per i topi BALB/c che sono stati stabulati per 14 mesi. La stabulazione e il trattamento dei topi erano conformi con la Guida per la Cura e l'Uso di animali da laboratorio del Ministero della Sanità DL 116, 1992 e approvati dal Comitato Etico per la sperimentazione animale (CESA) dell'Università degli Studi di Urbino Carlo Bo e dell'Università Sapienza di Roma.

3.3 Cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) per la determinazione dei tioli

La determinazione dei tioli in cellule RAW 264.7, plasma, milza, linfonodi, pancreas, cervello e polmoni è stata effettuata tramite un HPLC Jasco modello LG-980-02 [JASCO EUROPE SRL, Cremella (LC), Italia]. La colonna utilizzata era una Teknokroma tracer excel 120 ODSA 5 μ m 15x0.46 (Teknokroma Analitica SA, Barcellona, Spagna) con una pre-colonna Teknokroma Tracer Excel ODS 10x3,2 millimetri (Teknokroma Analitica SA, Barcelona, Spagna). La fase mobile era costituita da KH_2PO_4 10mM pH 6.0 (tampone A) e dal tampone A più acetonitrile al 60% (v/v) (tampone B). Tutte le soluzioni tampone, dopo la preparazione e la regolazione del pH, così come gli standard, sono stati filtrati attraverso un filtro Millipore di 0,22 micron. Le condizioni di eluizione erano: 10 minuti al 100% del tampone A, nei 15 minuti successivi il gradiente veniva modificato fino ad arrivare al 100% del tampone B, condizione questa

mantenuta per 5 minuti. Il gradiente veniva poi riportato al 100% del tampone A in 3 minuti. Il flusso era di 1 mL/minuto e la rivelazione veniva effettuata a 330 nm. Le analisi sono state eseguite a 25°C e le misurazioni quantitative sono state ottenute tramite iniezione di standard a concentrazione nota. La quantità iniettata in HPLC era di 50 µL.

3.4 Preparazione degli organi per l'analisi dei tioli tramite HPLC

In seguito all'asportazione degli organi, 10-20 mg di ciascun organo sono stati velocemente immersi in 500 µL di soluzione precipitante (100 mL di H₂O contenenti 0.18 g di EDTA, 30 g di NaCl e 1.67 g di acido metafosforico) ed omogenati. I campioni sono stati successivamente sonicati per 10 secondi a 40-50 Watt (B. Braun Labsonic U, B. Braun Biotech International), mantenuti in ghiaccio per 10 minuti e centrifugati a 15000 g a 4°C per 10 minuti.

Prima dell'analisi in HPLC a 60 µL di campione sono stati aggiunti 15 µL di Na₂HPO₄ 0.3 M e subito dopo 45 µL di DTNB preparato sciogliendo 20 mg di DTNB in 100 mL di soluzione sodio citrato (1% p/v). Tale miscela è stata agitata per 1 minuto a temperatura ambiente (TA), e lasciata per altri 5 minuti al buio a TA, infine è stata utilizzata per l'analisi dei tioli.

3.5 Validazione del metodo HPLC per la determinazione dei tioli negli organi di topo

Il metodo è stato validato su organi di topi ICR (CD-1) secondo le linee guide internazionali (US-FDA Bioanalytical Method Validation Guidance [123] e European Medicines Agency Guideline on Bioanalytical Method Validation [124]) valutando i parametri quali selettività, linearità, limite minimo di quantificazione (LLOQ), precisione, accuratezza, recovery e stabilità.

La selettività è stata valutata confrontando i cromatogrammi di standard di GSH e Cys con i cromatogrammi degli organi di topo.

Le curve di calibrazione sia per il GSH che per la Cys sono state ottenute analizzando diluizioni seriali di una soluzione madre. Le analisi sono state effettuate sia su standard diluiti in acqua che su standard diluiti nella soluzione utilizzata per precipitare le proteine degli organi. Le concentrazioni esatte delle soluzioni standard di GSH e Cys sono state ottenute attraverso letture spettrofotometriche a 412 nm seguendo la procedura descritta da Beutler [133]. La curva di calibrazione è stata disegnata ponendo l'area del picco sull'asse y e la concentrazione dello standard sull'asse delle x. Il punto più basso della curva con una precisione e un'accuratezza entro il 20% è stato definito come LLOQ.

La precisione e l'accuratezza del metodo sono state valutate analizzando campioni di ciascun organo a cui sono state aggiunte note concentrazioni di GSH (5, 20 e 60 µM) e di Cys (2.5, 20 e 40 µM) prima di sottoporlo all'intera procedura del metodo. Ogni campione

è stato analizzato almeno 5 volte. La precisione è stata valutata sia effettuando di ogni campione 5 replicati in un giorno (analisi intra-day) che analizzando lo stesso campione in 5 giorni diversi su due settimane (analisi inter-day). La precisione è stata definita come la deviazione standard relativa (RSD%), mentre l'accuratezza è stata definita come errore relativo (RE%), entrambi i parametri secondo le linee guida di validazione internazionali non devono eccedere il 15%.

Il recovery è stato calcolato aggiungendo concentrazioni note di GSH (5, 20 e 60 μM) e Cys (2.5, 20 e 40 μM) all'organo prima di sottoporlo alle fasi di elaborazione del metodo, e la concentrazione finale di ciascun campione rappresentava la media di cinque misurazioni. I risultati del recovery sono espressi come percentuale del valore teorico previsto.

La stabilità dei campioni è stata determinata analizzando organi che sono stati asportati, processati e lasciati 4 ore a temperatura ambiente, 8 ore a 4° C o sottoposti a congelamento e scongelamento per 3 volte. Inoltre, la stabilità è stata valutata su organi escissi e congelati nella soluzione precipitante a -80 °C per 3 mesi.

3.6 Colture cellulari di cellule RAW 264.7 e preparazione dei campioni per la determinazione dei tioli

Colture cellulari di cellule RAW 264.7 sono state risospese in terreno DMEM, completato con il 10% (v/v) di siero bovino fetale (FBS) inattivato alla temperatura di 56 °C per 30 minuti, 100 U/mL di penicillina, 100 $\mu\text{g/mL}$ di streptomycin e 2 mM di L-glutamina. Successivamente, sono state disposte su piastre per colture cellulari (7×10^5 cellule per piastra) e incubate (37 °C al 5% di CO_2) per una notte. La mattina seguente le cellule sono state lavate tramite due lavaggi con soluzione salina [NaCl 0.9%, K_2HPO_4 1 M, pH 7.4, (PBS)] e poi incubate con il DEM 6 mM per 15 minuti. In seguito a due ulteriori lavaggi con PBS, sono state incubate con GSH-C4 o I-152 a diverse concentrazioni per 2 h e infine lavate altre due volte con PBS. Ad ogni piastra sono stati aggiunti 100 μL di soluzione lisante (Triton-X 0.1%, PBS 0.1 M, EDTA 5 mM, pH 7.5), 15 μL di HCl 0.1 N e 140 μL di soluzione precipitante (100 mL di questa soluzione acquosa contiene: 1.67 g di acido metafosforico, 0.18 g di disodio EDTA e 30 g di NaCl). Le cellule sono state rimosse dalle piastre mediante uno scraper di gomma, il lisato cellulare recuperato è stato mantenuto in ghiaccio 10 minuti, poi centrifugato alla temperatura di 4 °C, per 10 minuti a 12000 xg. I sovranatanti sono stati mantenuti a -20 °C fino alla determinazione dei tioli in HPLC, mentre ai pellets sono stati aggiunti 100 μL di NaOH 0.1 N per effettuare il dosaggio delle proteine allo spettrofotometro.

Per la determinazione dei tioli sono stati prelevati 60 μL di campione a cui sono aggiunti 15 μL di Na_2HPO_4 10 mM e 7.5 μL di DTNB e analizzati in HPLC seguendo il metodo precedentemente descritto.

3.7 Dosaggio delle proteine allo spettrofotometro

In una cuvetta da 1 mL sono stati messi 200 μ L di colorante Bradford, 10 o 20 μ L di campione e rispettivamente 790 o 780 μ L di H₂O. Successivamente è stata effettuata la lettura ad una lunghezza d'onda di 595 nm per determinare il quantitativo proteico totale del campione secondo la procedura descritta nel Beutler [133]. Si è proceduto poi al calcolo delle concentrazioni tenendo conto delle varie diluizioni effettuate.

3.8 Infezione da LP-BM5, trattamento e sacrificio degli animali

Lo stock di virus usato per indurre il MAIDS è stato preparato da co-coltura di cellule G6 con cellule SC-1 come precedentemente descritto [134]. Le linee cellulari sono state gentilmente forniteci dalla Dr. Kathy Green del Dipartimento di Microbiologia e Immunologia, Geisel School of Medicine (Dartmouth). Per lo studio della risposta immunitaria topi femmina C57BL/6 sono stati infettati con due iniezioni intraperitoneali, a distanza di 24 ore l'una dall'altra, di 0.1 mL ciascuna dello stock virale LP-BM5 contenente 0.25 U di trascrittasi inversa. Dopo 2, 5 e 9 settimane dall'infezione, 5 topi infettati e 5 topi non infettati di controllo sono stati sacrificati.

Per lo studio della capacità del GSH-C4 e I-152 di modulare la risposta immunitaria topi femmina C57BL/6 sono stati infettati con due iniezioni intraperitoneali, a distanza di 24 ore l'una dall'altra, di 0.150 mL ciascuna dello stock virale LP-BM5 contenente 0.5 U di trascrittasi inversa, e in seguito trattati con 32.5 μ mol/topo di I-152 o GSH-C4 in un volume finale di 200 μ L di NaCl 0.9% (p/v) o con 200 μ L di NaCl 0.9% (p/v) (placebo) per 3 volte a settimane. Dopo 2, 5 e 9 settimane dall'infezione, 8 topi di ogni gruppo sono stati sacrificati. In seguito al sacrificio ad ogni tempo ciascun topo è stato utilizzato per il prelievo del sangue e per l'espanto di milza, linfonodi, pancreas e cervello. Il sangue è stato centrifugato a 1050 g per 5 minuti, per separare il plasma che, suddiviso in aliquote, è stato congelato ad una temperatura di -80 °C fino al momento dell'analisi delle immunoglobuline.

3.9 Dosaggio delle immunoglobuline G (IgG) ed immunoglobuline E (IgE) in plasma di topi C57BL/6

I livelli di IgG nel plasma sono stati determinati tramite un saggio immunoenzimatico ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) come precedentemente descritto [135].

I livelli di IgE nel plasma sono stati determinati mediante un kit ELISA fornito da Bethyl Laboratories, Inc. (Montgomery, Texas), seguendo le istruzioni indicate nella brochure in dotazione. La curva standard per le IgE è stata ottenuta utilizzando la proteina ricombinante fornito dal produttore.

Ad ogni tempo analizzato (2, 5 e 9 settimane dall'infezione) sono stati testati i plasma di 5 topi infettati e 5 topi di controllo.

3.10 Determinazione di citochine Th1/Th2 in surnatanti di splenociti ottenuti da milze di topi

Gli splenociti sono stati isolati da milze provenienti da topi infettati con LP-BM5 e da topi non infettati seguendo una procedura precedentemente descritta [136].

Gli splenociti sono stati mantenuti in coltura in RPMI 1640, contenente il 10% (v/v) di FBS inattivato al calore (56 °C per 30 minuti), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL streptomicina e 2mM L-glutamina, per 72 h. A questo tempo i surnatanti sono stati raccolti e conservati a -80°C fino al momento dell'analisi.

Il dosaggio delle citochine presenti nei campioni è stato eseguito mediante la tecnica del Multiplex ImmunoAssay (Bio-Plex) Bio-Rad. La lettura della piastra è stata eseguita mediante il lettore Bio-Plex 200 Array Reader, basato sulla tecnologia X-Map Luminex, che permette di misurare la concentrazione degli analiti su volumi ridotti di campione (25 µL). Per eseguire l'esperimento sono stati utilizzati i kit commerciali con pannello 8-plex (Pro Mouse Cytokine Th1/Th2, group I – Bio-Rad™) che consentono il dosaggio simultaneo di 8 citochine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, GM-CSF, IFN-γ, TNF-α) in ogni singolo pozzetto di una piastra ELISA da 96 pozzetti. Ogni esperimento è stato eseguito in duplicato utilizzando il protocollo suggerito dal produttore. In particolare i campioni sono stati scongelati e centrifugati a 3500 g per 10 minuti al fine di ottenere il surnatante sul quale eseguire le analisi. La curva standard di riferimento è stata ottenuta seguendo le istruzioni del produttore.

3.11 Purificazione di RNA, sintesi del DNA e real-time PCR

L'espressione delle citochine (IFN-γ, IL-10, IL-2, IL-27, IL-4, IL- e, IL-12b) è stata valutata nella milza di 3 topi di controllo e 3 topi infettati con LP-BM5 a 2, 5 e 9 settimane dall'infezione utilizzando un RT² profiler PCR array (SABiosciences).

L'RNA totale è stato estratto da 8-10 mg di tessuto di milza, conservato nella soluzione RNA later (Qiagen), utilizzando l'RNeasy mini kit (Qiagen). L'RNA è stato quantificato utilizzando uno spettrofotometro UV-2401PC (Shimadzu). Il cDNA è stato sintetizzato da 0,8 µg di RNA totale utilizzando il kit RT² first strand cDNA synthesis (Qiagen) seguendo le istruzioni del produttore. Le reazioni di real-time PCR (20 µl di volume totale) sono state effettuate utilizzando RT² Profiler PCR array con RT² SYBR Green ROX FAST Mastermix (Qiagen) e un Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). Il protocollo della PCR era costituito da un ciclo di 10 minuti a 95 °C, seguito da 40 cicli di denaturazione a 95 °C per 15 secondi, annealing ed estensione a 60 °C per 1 minuto. Il cDNA di topi non infettati è stato utilizzato come

calibratore. L'analisi dei dati si è basata sul metodo $\Delta\Delta C_t$ con la normalizzazione dei dati grezzi sui geni housekeeping ed è stata effettuata utilizzando il software di analisi dati RT² Profiler PCR Array (SABiosciences).

L'mRNA dell'IL-12 p40 nei macrofagi peritoneali è stato quantificato come precedentemente descritto [118].

3.12 Isolamento e coltura di macrofagi peritoneali murini

Le cellule di essudato peritoneale di topi C57BL/6 sono state ottenute mediante lavaggio peritoneale con 10 mL di soluzione salina bilanciata di Hank fredda, a cui sono stati aggiunti 10U/mL di eparina. Le cellule sono state messe in centrifuga per 10 minuti a 4 °C a 300xg, il surnatante è stato recuperato e gettato e le cellule sono state lavate due volte e risospese in terreno DMEM, completato con il 10% (v/v) di FBS inattivato al calore (56 °C per 30 minuti), 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL streptomycin e 2mM L-glutamina. Si è quindi proceduto alla piastratura delle cellule (2×10^6 /piastra) su dischi di plastica (35mm, Sarstedt, Italia). Le piastre sono state incubate al 5% di CO₂ a 37 °C per una notte per permettere l'adesione dei macrofagi. La mattina seguente le cellule non adese sono state eliminate tramite due lavaggi con soluzione salina [NaCl 0.9%, K₂HPO₄ 1M, pH 7.4, (PBS)], e le restanti sono state incubate per 24 ore con il complesso retrovirale LP-BM5 contenente 1.7 U di trascrittasi inversa. Dopo la rimozione dei virus, le cellule sono state lavate una volta con PBS e dopo 3 e 6 giorni dall'infezione il contenuto di DNA BM5d, l'espressione dell'mRNA di IL-12 p40 e il contenuto tiolico sono stati quantificati.

3.13 Quantificazione del DNA BM5d in milza, linfonodi e macrofagi peritoneali

Dopo 9 settimane dall'infezione il contenuto di DNA BM5d è stato analizzato nei linfonodi e nella milza di topi infettati con LP-BM5 e in topi di controllo. Il DNA cellulare totale è stato isolato da 10-20 mg di tessuto congelato e purificato seguendo un metodo precedentemente descritto [137].

Dopo 3 e 6 giorni dall'infezione il DNA cellulare è stato isolato da circa $1,5 \times 10^5$ macrofagi utilizzando il QIAamp DNA mini kit (Qiagen) seguendo le istruzioni del produttore.

La concentrazione di DNA è stata valutata con un spettrofotometro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA) ed i rapporti di assorbanza di 260/280 e 260/230 sono stati usati per controllarne la qualità; tutti i campioni avevano un rapporto di circa 1.8 e 2.0, rispettivamente, e sono stati accettati come DNA "puro". La quantificazione di DNA BM5d è stata effettuata tramite SYBR green I real-time PCR come precedentemente descritto [138]. Le reazioni sono state effettuate tramite un Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR, in un volume finale di 50 µL, usando la master mix Hot-Rescue Real Time PCR Kit-SG (Diatheva srl, Fano, Italia) e 50-100 ng di DNA. Il numero di

copie di DNA BM5d è stato calcolato tramite curva standard e normalizzate su 100 ng di DNA.

3.14 Valutazione della capacità di GSH-C4 e I-152 di aumentare il contenuto tiolico in organi di topo C57BL/6

Per valutare la capacità di GSH-C4 e I-152 di aumentare il contenuto tiolico in organi di topo, 3 topi femmina C57BL/6 sono stati trattati con il GSH-C4 e 3 topi femmina C57BL/6 sono stati trattati con l'I-152 tramite iniezione intraperitoneale (i.p.). Entrambe le molecole sono state iniettate ad una concentrazione di 32,5 μ mol/topo in un volume finale di 200 mL di NaCl 0.9% (p/v). Tre topi C57BL/6 utilizzati come controllo hanno ricevuto 200 mL di NaCl allo 0,9% (p/v). Dopo 30, 60 e 240 minuti, gli organi quali milza, linfonodi, pancreas e cervello sono stati asportati e trattati come sopra descritto.

La determinazione dei tioli negli organi è stata effettuata tramite il metodo HPLC precedentemente descritto.

3.15 Infezione con il virus dell'influenza, trattamento e sacrificio degli animali

Cinque topi femmina BALB/c di 13 mesi sono stati infettati con 0,5 unità formanti placca (PFU)/topo del virus dell'influenza A/PR8/ceppo H1N1 per imitare un'influenza stagionale mite, e quotidianamente sono stati trattati con 7,4 mg di GSH-C4 per i successivi 7 giorni. Un gruppo (n=5) di topi infettati è stato similmente trattato con il placebo.

In seguito al sacrificio ciascun topo è stato utilizzato per il prelievo del sangue, del lavaggio bronco-alveolare e per l'espanto dei polmoni. Il sangue è stato centrifugato a 1050 g per 5 minuti, per separare il plasma che, suddiviso in aliquote, è stato congelato ad una temperatura di -80 °C fino al momento dell'analisi delle immunoglobuline.

3.16 Recupero del lavaggio bronco-alveolare di topi BALB/c

Dopo il sacrificio dei topi infettati con il virus dell'influenza e trattati con il GSH-C4 o con il placebo, un catetere 23-gauge sterile è stato inserito nel lume tracheale e sono state effettuate due infusioni di PBS sterile (0,8 mL) contenente inibitori delle proteasi (Sigma-Aldrich) per la raccolta del fluido broncoalveolare come descritto precedentemente [139]. I campioni recuperati sono stati poi centrifugati a 1000 xg per 15 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato congelato a -80 °C fino al momento dell'analisi.

3.17 Determinazione di citochine Th1/Th2 nel fluido broncoalveolare di topi BALB/c

I livelli di citochine (IL-4, IL-5, IL-10, IL-2, IL-12 e IFN- γ) nel lavaggio broncoalveolare di topi sono stati determinati usando la tecnica del Multiplex ImmunoAssay (Bio-Plex) Bio-Rad seguendo le istruzioni del produttore. La lettura della piastra è stata eseguita mediante il lettore Bio-Plex MAGPIX (Bio-Rad). I dati sono stati analizzati utilizzando il software Bio-pro e i risultati sono stati espressi come nanogrammi per millilitro. Tutti gli standard e i campioni sono stati eseguiti in duplicato.

3.18 Titolo virale nei polmoni di topi BALB/c

In seguito all'espianto i polmoni sono stati pesati e immediatamente congelati a -80 °C fino al momento dell'analisi. L'RNA totale è stato estratto con TRI Reagent (Sigma-Aldrich) seguendo il protocollo del produttore. Brevemente, i polmoni sono stati omogenizzati nel reagente TRI (1 mL/75 mg di tessuto) tramite omogenizzatore Polytron, quindi 0,1 mL di 1-bromo-3-cloropropano è stato aggiunto. La miscela è stata centrifugata a 12000 xg per 15 minuti a 4 °C. In seguito la fase acquosa è stata trasferita in una provetta e ad essa è stata aggiunto 0,5 mL di 2-propanolo prima di essere centrifugata a 12000 xg per 10 minuti a 4 °C. Il surnatante è stato rimosso e il pellet di RNA è stato essiccato all'aria per 30 minuti dopo di che sono stati aggiunti 100 μ L di dietilpirocarbonato e per facilitarne la risospensione la miscela è stata riscaldata per 15 minuti a 55 °C. In seguito all'isolamento l'RNA è stato trattato con DNase I (Invitrogen). La qualità e la quantità di RNA isolato è stata determinata spettrofotometricamente (Pearl IMPLen nanophotometer). Il numero di copie virali RNA M1 è stato determinato tramite una quantitativa Real-Time PCR utilizzando sia One Step Influenza A/B r-gene che Quanti FluA q5 kits (Argene).

3.19 Dosaggio delle immunoglobuline IgG1 ed IgG2a in plasma di topi BALB/c

I livelli di IgG1 ed IgG2a sono stati determinati tramite un saggio Elisa. Brevemente, è stato fatto l'adsorbimento (coating) su micropiastre (Nunc-immuno Plate MaxiSorp Surface, Nunc) con l'anticorpo primario Goat anti mouse IgG1 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) o IgG2 (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) diluito 1:100 in NaCl 0.135 M incubato over night (ON) a 37°C. In seguito, le piastre sono state lavate 4 volte con il buffer di lavaggio [NaH₂PO₄ 10mM, NaCl 154 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.0 (TPBS)] e bloccate con 5% di siero bovino di albumina (BSA) in PBS (NaH₂PO₄ 10 mM, NaCl 154 mM) per un'ora a 37 °C. Dopo 4 lavaggi in TPBS, diluizioni seriali di plasma murino in sodio borato 50 mM pH 8.5 sono state piastrate e incubate per un'ora a 37 °C. Alla fine dell'incubazione sono stati effettuati 4 lavaggi in PBS ed è stato aggiunto l'anticorpo secondario Goat anti mouse IgG - horseradish

peroxidase (HRP) conjugate (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) diluito 1:1000 in PBS. Dopo l'incubazione un'ora a 37 °C, i livelli plasmatici di IgG1 ed IgG2a sono stati determinati usando una soluzione colorante contenente 0.8 mg/mL di Orthophenyenediamine e 1 μ L/mL di H₂O₂ in sodio citrato 50 mM pH 3.0. Infine è stata letta l'assorbanza a 492 nm dopo 3 minuti con microplate reader (BIORAD).

3.20 Studio statistico

Lo studio statistico è stato effettuato utilizzando il Mann-Whitney Test per tutti i parametri eccetto per l'analisi dei tioli in organi di topo di controllo in seguito al trattamento con GSH-C4 e I-152, per l'analisi degli mRNA di citochine sulle milze di topi infettati con LP-BM5 e per tutti gli esperimenti *in vitro* in cui è stato utilizzato il test T di Student, considerando significativo un $p \leq 0.05$.

4. RISULTATI

4.1 Validazione di un metodo HPLC per la determinazione simultanea del glutathione ridotto e della cisteina

Per studiare lo stato redox intracellulare negli organi di topo di controllo o di topi infettati è stato necessario innanzitutto mettere a punto un metodo analitico riproducibile e selettivo che ci permettesse di quantificare le principali specie tioliche, quali GSH e Cys in milza, linfonodi, pancreas e cervello.

Dapprima sono stati individuati i quantitativi di organo e i volumi più opportuni che permettessero la migliore resa (risultati non mostrati). L'obiettivo successivo è stato quello di validare il metodo seguendo le linee guida di validazione internazionali [123, 124]. La validazione è stata effettuata utilizzando organi di topo ICR (CD-1.) I parametri fondamentali per la validazione secondo gli standard internazionali sono la selettività, la linearità, la sensibilità, l'accuratezza, la precisione, la riproducibilità e la stabilità del campione.

Selettività

La selettività è la capacità di un metodo analitico di differenziare e quantificare un analita anche in presenza di altri componenti all'interno del campione. Il tempo di ritenzione del GSH è risultato essere 14.8 ± 0.5 minuti, mentre quello della Cys 6.7 ± 0.4 minuti. Non è stata osservata alcuna interferenza significativa da parte di sostanze endogene. In figura 5 è mostrato un cromatogramma rappresentativo di standard di GSH e Cys (a) e di una milza di topo (b). I cromatogrammi degli altri organi erano paragonabili ai cromatogrammi della milza (dati non mostrati).

Linearità ed LLOQ

Per la curva di calibrazione sono stati utilizzati standard diluiti sia in acqua che nella soluzione precipitante utilizzata per processare i campioni e precipitare le proteine. Le due curve ottenute sono comparabili e la figura 6 mostra la curva di calibrazione per il GSH (a) e per la Cys (b) diluiti nella soluzione precipitante. Il range di linearità per il GSH è 1.25-80 μM , mentre per la Cys è 0.313-50 μM .

Il limite minimo di quantificazione (LLOQ) per il GSH è di 1.25 μM con una RSD% inferiore ad 11 ed un RE% inferiore a 9. L'LLOQ della Cys è di 0.313 μM con una RSD% ed un RE% inferiori ad 8 e 5 rispettivamente.

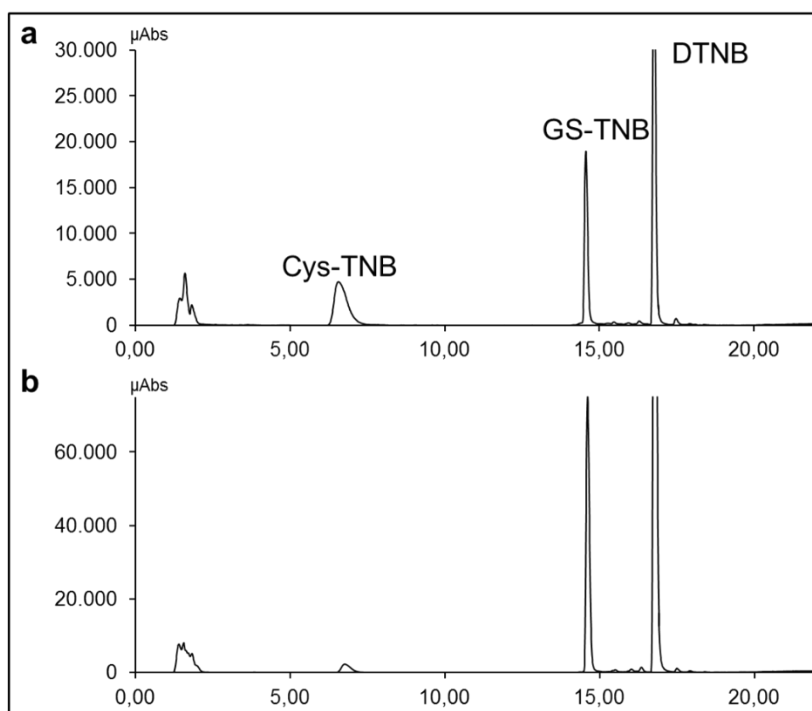


Figura 5. Cromatogrammi HPLC di standard di GSH e Cys (20 μM) (a), e di un estratto di milza di topo (b). Le concentrazioni esatte delle soluzioni standard di GSH e Cys sono state ottenute attraverso letture spettrofotometriche a 412 nm, come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

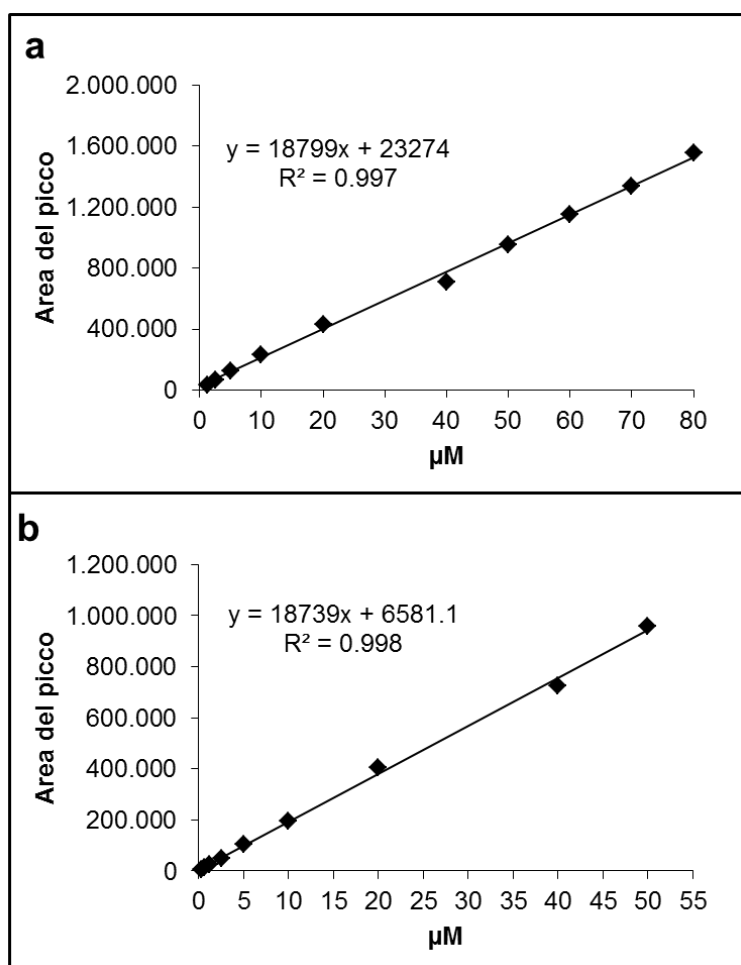


Figura 6. Curve di calibrazione del GSH (a) e della Cys (b) diluiti nella soluzione usata per precipitare le proteine degli organi. Le soluzioni standard sono state quantificate mediante letture spettrofotometriche a 412 nm, come descritto nella sezione Materiali e Metodi.

Stabilità del campione

Uno dei requisiti fondamentali per un'analisi sperimentale affidabile è la stabilità dei composti tiolici durante la conservazione prolungata dei tessuti nella soluzione di precipitazione delle proteine o dei tessuti deproteinizzati. La stabilità è stata valutata mantenendo il tessuto nel buffer di precipitazione delle proteine per 3 mesi a -80 °C, e sull'estratto deproteinizzato mantenuto 4 ore a temperatura ambiente o 8 ore a 4 °C e sottoponendolo a congelamento e scongelamento per 3 volte. I risultati sono mostrati nella tabella 1 e mostrano come non vi è alcuna differenza significativa nelle aree dei picchi sia del GSH che della Cys (RE% <15).

Tabella 1. Stabilità del GSH e della Cys in organi di topo.

Campione	-80 °C 3 mesi	T.A. 4 h	4 °C 8 h	3 cicli congelamento/scongelamento
GSH				
Milza	99.9 ± 2.4	97.7 ± 1.7	98.9 ± 2.9	99.2 ± 1.9
Linfonodi	98.9 ± 1.5	97.9 ± 2.3	99.1 ± 6.9	100.1 ± 1.9
Pancreas	99.3 ± 4.0	97.9 ± 2.0	98.0 ± 3.5	98.4 ± 4.1
Cervello	99.6 ± 2.4	99.9 ± 7.5	99.1 ± 7.3	98.7 ± 1.4
Cys				
Milza	101.1 ± 4.2	97.6 ± 3.0	99.3 ± 2.9	98.7 ± 1.0
Linfonodi	97.8 ± 4.6	98.7 ± 7.8	99.8 ± 1.9	98.4 ± 3.9
Pancreas	97.6 ± 2.2	103.0 ± 3.2	96.9 ± 1.8	98.9 ± 1.4
Cervello	99.1 ± 2.3	98.4 ± 1.4	99.0 ± 5.1	98.5 ± 3.9

Nella prima colonna i valori si riferiscono agli organi lasciati immersi nella soluzione utilizzata per precipitare le proteine. Nella seconda, terza e quarta colonna i valori si riferiscono agli omogenati di organo deproteinizzati. T.A.: temperatura ambiente. I valori sono la media ± DS di 5 animali per organo. I campioni utilizzati per la stabilità sono stati confrontati con gli stessi campioni immediatamente processati ed analizzati.

Precisione, accuratezza e recovery

L'accuratezza di un metodo analitico descrive la differenza tra il valore medio di una serie di valori misurati e il valore vero o di riferimento. La precisione invece fa riferimento al grado di "convergenza" (deviazione standard) delle misure individuali rispetto al valore medio della serie a cui appartengono. Il recovery è un parametro che indica la quantità di un analita determinata da un metodo di analisi rispetto alla quantità totale e reale, permettendo di quantificare le perdite di analita durante tutta la procedura sperimentale. Come descritto nella sezione "Materiali e Metodi", la precisione, l'accuratezza e il recovery del metodo sono stati valutati aggiungendo 60 µM, 20 µM o 5 µM di GSH, o 40 µM, 20 µM o 2.5 µM di Cys ai tessuti prima che questi venissero sottoposti all'intera procedura. Ogni concentrazione è stata testata 5 volte e i risultati sono mostrati in tabella 2. Tutti i risultati rientrano nei criteri di accettabilità descritti nelle linee guida di validazione internazionale. In particolare, in tutti i campioni di organi analizzati, la precisione (RSD%) intra-day (n=5) è

inferiore all'11%, mentre la precisione inter-day (n=5) è inferiore al 14% per entrambe le specie tioliche. L'analisi dell'accuratezza (RE%) ha dimostrato che in tutti i campioni tale parametro è inferiore al 9% per entrambe le specie tioliche, ad eccezione del cervello in cui è stato aggiunto 5 μ M di GSH in cui risulta essere meno del 14%, rientrando comunque nei limiti di accettazione.

Per il recovery, la concentrazione dei campioni ottenuta è stata espressa come percentuale della concentrazione prevista, questa è stata ricavata sommando la concentrazione aggiunta e la concentrazione endogena dell'analita ottenuta da un campione dello stesso organo processato ed analizzato senza l'aggiunta di concentrazioni note dell'analita. I risultati ottenuti mostrano come il recovery medio (n=5) in tutti i campioni analizzati sia più del 90% per il GSH e più del 93% per la Cys, tranne che per il cervello a cui è stato aggiunto 5 μ M di GSH in cui risulta più dell'86%.

Tabella 2. Sintesi di precisione, accuratezza e recovery per la quantificazione del GSH e della Cys in milza, linfonodi, pancreas e cervello di topi ICR (CD1) (n = 5).

Campione	Concentrazione (μ M)	Intra-day (RSD%)	Inter-day (RSD%)	Accuratezza (RE%)	Recovery (% , media \pm DS)
GSH					
Milza	5	3.3	7.5	3.5	92.7 \pm 2.2
	20	10.8	9.7	3.3	93.5 \pm 4.6
	60	9.0	12.4	1.9	94.7 \pm 5.2
Linfonodi	5	10.8	12.4	8.9	90.4 \pm 2.0
	20	1.9	6.2	3.7	96.4 \pm 1.5
	60	1.5	9.7	4.5	93.7 \pm 4.8
Pancreas	5	9.9	12.8	3.3	91.4 \pm 2.8
	20	7.5	9.4	5.0	97.4 \pm 3.2
	60	9.3	13.7	6.4	91.1 \pm 6.3
Cervello	5	2.6	12.6	13.7	86.5 \pm 5.0
	20	4.4	10.7	1.2	98.2 \pm 3.7
	60	9.0	8.1	5.3	94.3 \pm 7.2
Cys					
Milza	2.5	4.6	11.7	3.8	98.4 \pm 1.3
	20	5.3	8.0	5.8	96.8 \pm 2.4
	40	4.6	3.9	2.6	97.7 \pm 2.1
Linfonodi	2.5	6.9	8.9	5.1	97.0 \pm 2.3
	20	9.0	12.9	4.8	96.8 \pm 2.6
	40	5.0	11.7	6.2	93.9 \pm 5.7
Pancreas	2.5	9.1	10.7	4.3	94.2 \pm 5.6
	20	7.5	6.8	8.5	94.5 \pm 4.2
	40	6.2	9.9	5.7	95.6 \pm 2.7
Cervello	5	2.6	12.6	13.7	86.5 \pm 5.0
	20	4.4	10.7	1.2	98.2 \pm 3.7
	60	9.0	8.1	5.3	94.3 \pm 7.2

4.2 Studio della capacità dell'I-152 e del GSH-C4 di ripristinare il contenuto tiolico in cellule RAW 264.7 in seguito a deplezione del GSH

L'obiettivo di questi esperimenti nasce dall'intenzione di studiare il comportamento e verificare l'effettiva capacità dell'I-152 e del GSH-C4 di ripristinare il corretto contenuto di GSH in cellule in cui è stata indotta sperimentalmente una deplezione del tripeptide. A tal fine, sono state utilizzate cellule macrofagiche murine RAW 264.7 in cui tale deplezione è stata indotta con il DEM (Dietilmaleato) 6 mM per 15 minuti. Questa molecola altera il rapporto GSH/GSSG coniugandosi al GSH mediante una reazione catalizzata dalla GST, abbassando tale rapporto si determina un accumulo di ROS e di conseguenza stress ossidativo.

Capacità di I-152 di ripristinare il contenuto tiolico in cellule RAW 264.7

Per valutare la capacità di I-152 di ripristinare il contenuto tiolico, cellule RAW 264.7 sono state pre-trattate con DEM 6 mM per 15 minuti e in seguito incubate con concentrazioni crescenti (1, 5, 10 e 20 mM) di I-152 per due ore come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". In queste cellule è stato quantificato il GSH e i risultati sono mostrati in figura 7. Il pre-trattamento con il DEM ha causato una diminuzione estremamente significativa del tripeptide, mentre la successiva incubazione con I-152 1 mM ha favorito un ripristino significativo del GSH fino a concentrazioni analoghe a quelle di un controllo. Le concentrazioni invece più elevate della molecola (5, 10 e 20 mM) hanno ulteriormente depletato il GSH in modo significativo rispetto al pre-trattamento con il DEM. Sulla base di questi risultati è stato ritenuto opportuno eseguire delle prove per valutare il comportamento di I-152 a concentrazione più basse (0.5 e 0.1 mM), le quali hanno mostrato la capacità non solo di ripristinare il GSH in seguito a deplezione prodotta dal DEM, ma anche di causare un aumento, seppur non significativo, della concentrazione del tripeptide rispetto ai controlli (figura 6). Il pre-trattamento con il DEM ha causato nelle cellule anche una deplezione significativa delle Cys, che poteva essere ripristinata con le concentrazioni più bassi della molecola, quali 0.5 e 0.1 mM (figura 9).

Nelle stesse cellule sono state quantificate anche I-152 e i suoi metaboliti, quali NAC e cisteamina, quest'ultima presente solo in un campione di RAW 264.7 trattate con I-152 20 mM (dati non mostrati). I risultati di tale determinazione sono mostrati in figura 10, dove si può notare come le concentrazioni di I-152 e NAC intracellulari aumentano in maniera dose-dipendente.

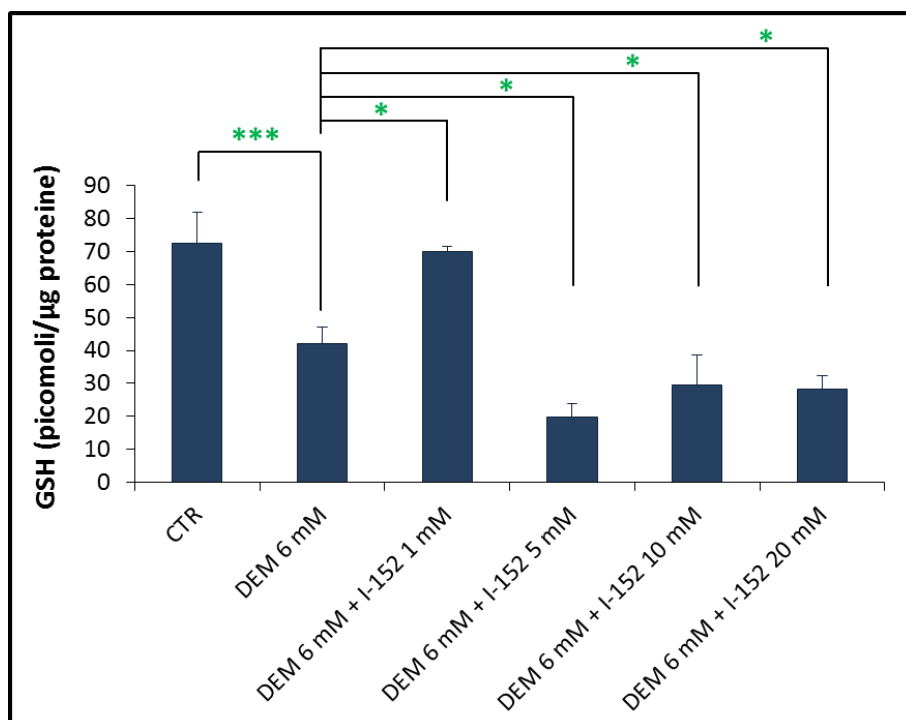


Figura 7. Livelli di GSH in cellule RAW 264.7 pre-trattate con DEM 6 mM per 15 minuti e successivamente trattate per 2 ore con I-152 1, 5, 10 e 20 mM. Le cellule sono state poi utilizzate per la determinazione delle varie specie tioliche tramite HPLC come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. I risultati rappresentano la media \pm DS di almeno tre esperimenti condotti separatamente. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0005$.

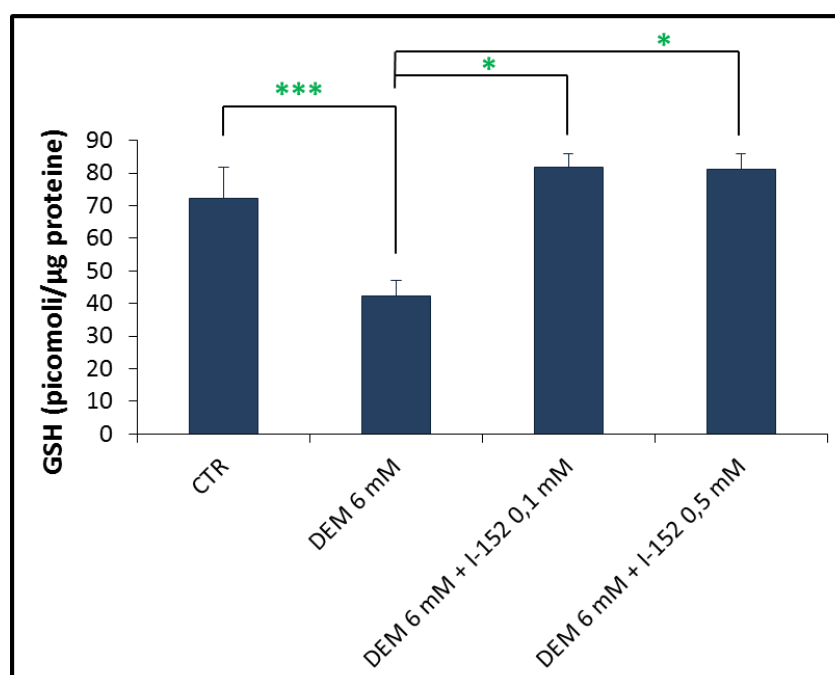


Figura 8. Livelli di GSH in cellule RAW 264.7 pre-trattate con DEM 6 mM per 15 minuti e successivamente trattate per 2 ore con I-152 0.1 e 0.5 mM. Le cellule sono state poi utilizzate per la determinazione delle varie specie tioliche tramite HPLC come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. I risultati rappresentano la media \pm DS di almeno tre esperimenti condotti separatamente. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0005$.

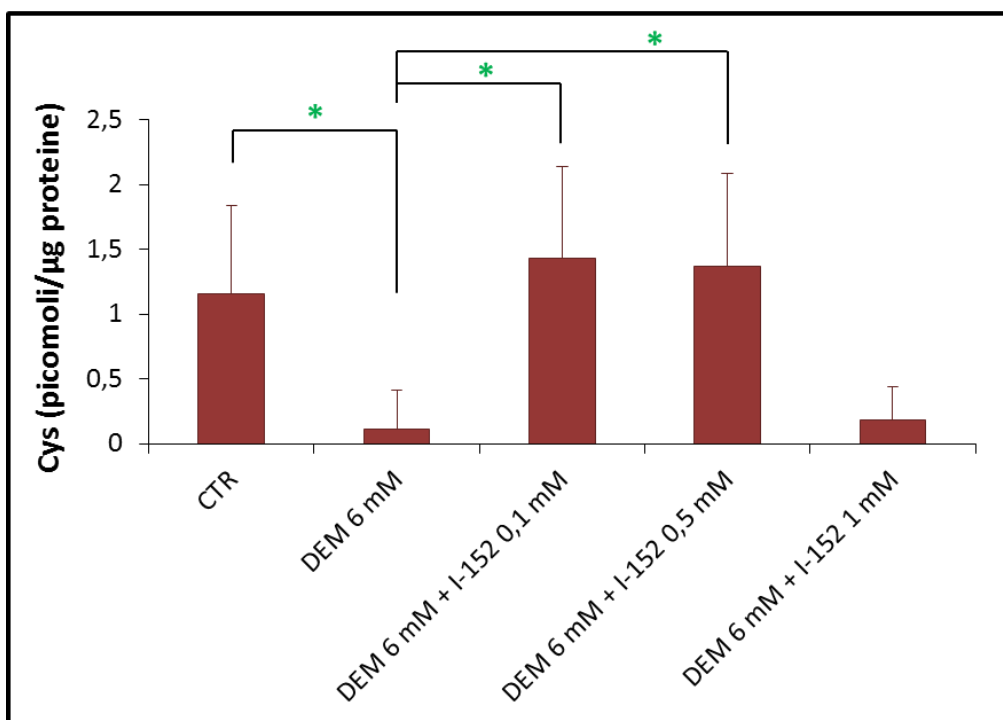


Figura 9. Livelli di Cys in cellule RAW 264.7 pre-trattate con DEM 6 mM per 15 minuti e successivamente trattate per 2 ore con I-152 0.1, 0.5 e 1 mM. Le cellule sono state poi utilizzate per la determinazione delle varie specie tioliche tramite HPLC come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. I risultati rappresentano la media \pm DS di almeno tre esperimenti condotti separatamente. * $p \leq 0,05$.

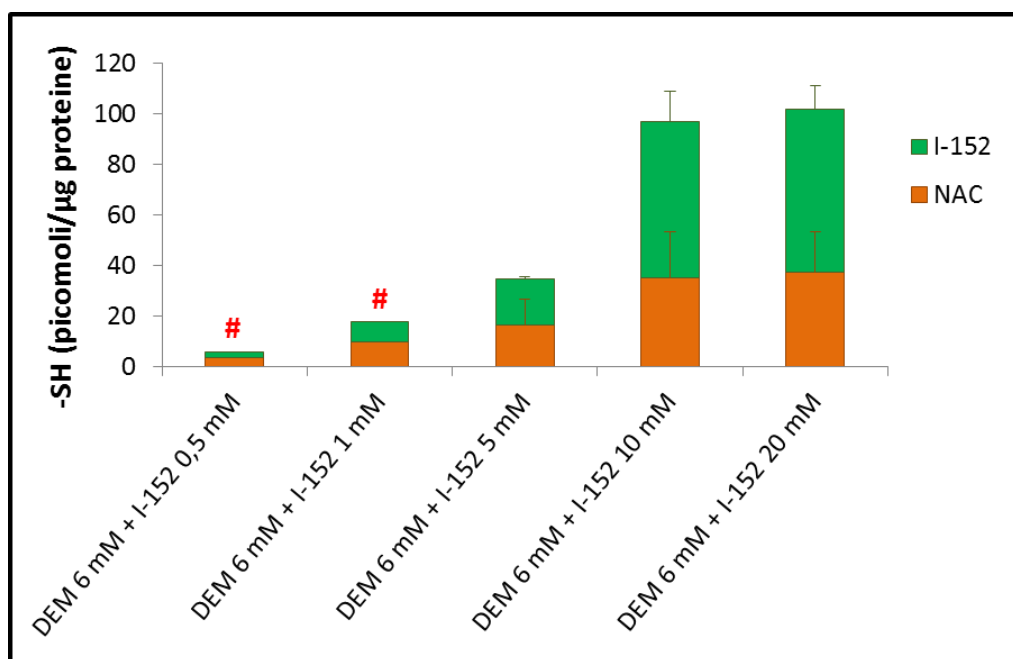


Figura 10. Livelli di I-152 e NAC in cellule RAW 264.7 pre-trattate con DEM 6 mM per 15 minuti e successivamente trattate per 2 ore con I-152 1, 5, 10 e 20 mM. Le cellule sono state poi utilizzate per la determinazione delle varie specie tioliche tramite HPLC come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. I risultati rappresentano la media \pm DS di almeno tre esperimenti condotti separatamente. # è riportato un solo valore, nelle altre prove le due specie tioliche non erano quantificabili.

Capacità del GSH-C4 di ripristinare il contenuto tiolico in cellule RAW 264.7

Al fine di valutare la capacità del GSH-C4 di ripristinare il contenuto tiolico, cellule RAW 264.7 in seguito al pre-trattamento con DEM 6 mM sono state incubate con concentrazioni crescenti (1, 5, 10 e 20 mM) della molecola, e il contenuto intracellulare di GSH (Figura 11) e Cys, (Figura 12) è stato valutato mediante HPLC come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. La concentrazione di GSH intracellulare in seguito al trattamento con il GSH-C4 viene aumentata in modo significativo in cellule pre-trattate con il DEM. Questa situazione è riscontrabile con tutte le concentrazioni testate di GSH-C4. La molecola inoltre è in grado di ripristinare anche il contenuto intracellulare di Cys in modo dose dipendente, fino ad essere circa quattro volte più elevata rispetto ai valori di controllo in seguito al trattamento con la concentrazione di 20 mM.

Nelle stesse cellule è stata determinata anche la concentrazione di GSH-C4 intracellulare che come mostrato in figura 13 aumenta in maniera dose dipendente.

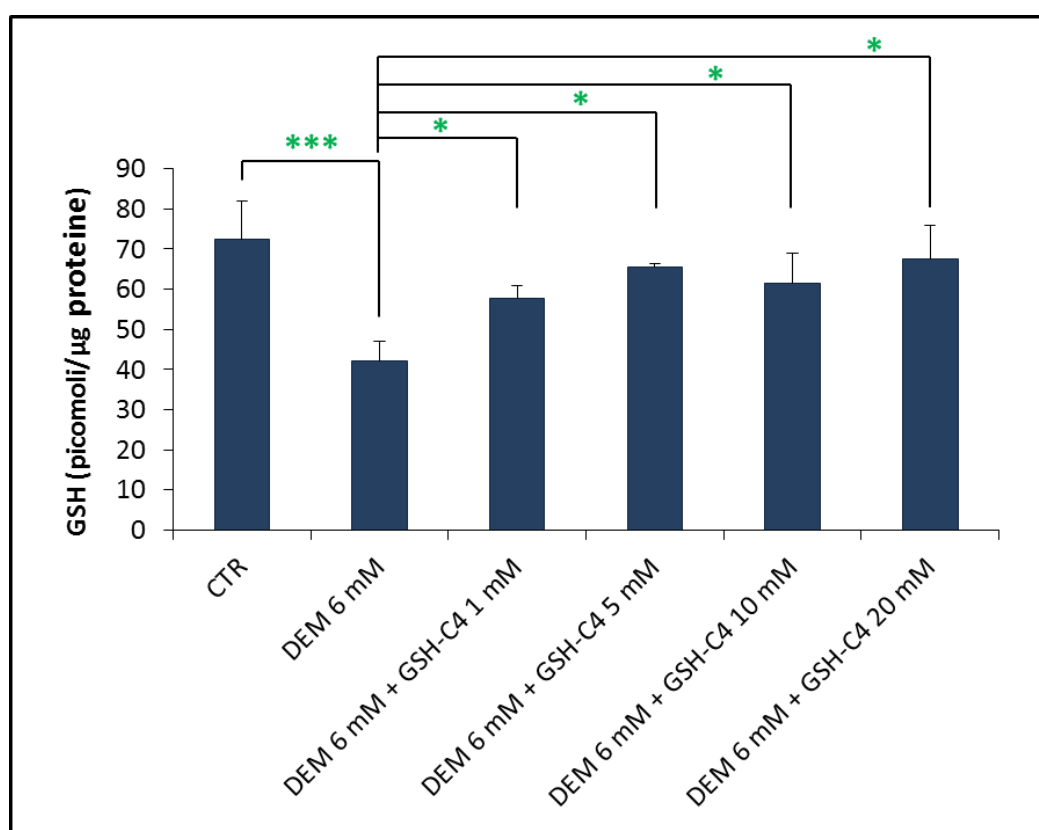


Figura 11. Livelli di GSH in cellule RAW 264.7 pre-trattate con DEM 6 mM per 15 minuti e successivamente trattate per 2 ore con GSH-C4 1, 5, 10 e 20 mM. Le cellule sono state poi utilizzate per la determinazione delle varie specie tioliche tramite HPLC come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. I risultati rappresentano la media \pm DS di almeno tre esperimenti condotti separatamente. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,0005$.

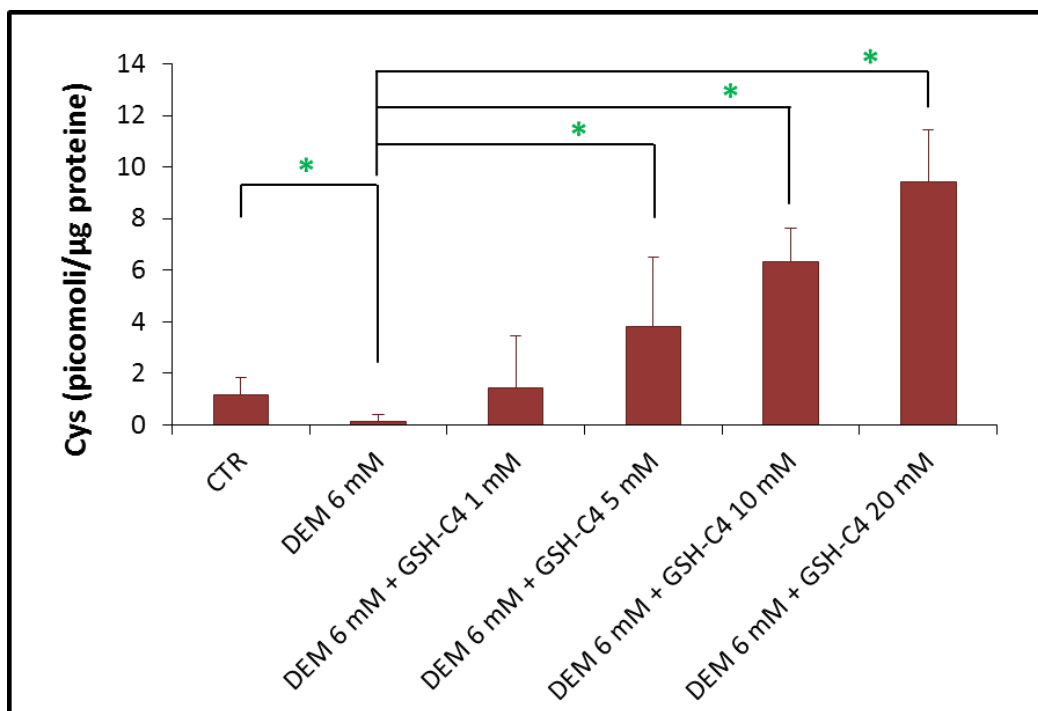


Figura 12. Livelli di Cys in cellule RAW 264.7 pre-trattate con DEM 6 mM per 15 minuti e successivamente trattate per 2 ore con GSH-C4 1, 5, 10 e 20 mM. Le cellule sono state poi utilizzate per la determinazione delle varie specie tioliche tramite HPLC come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. I risultati rappresentano la media \pm DS di almeno tre esperimenti condotti separatamente. * $p \leq 0,05$.

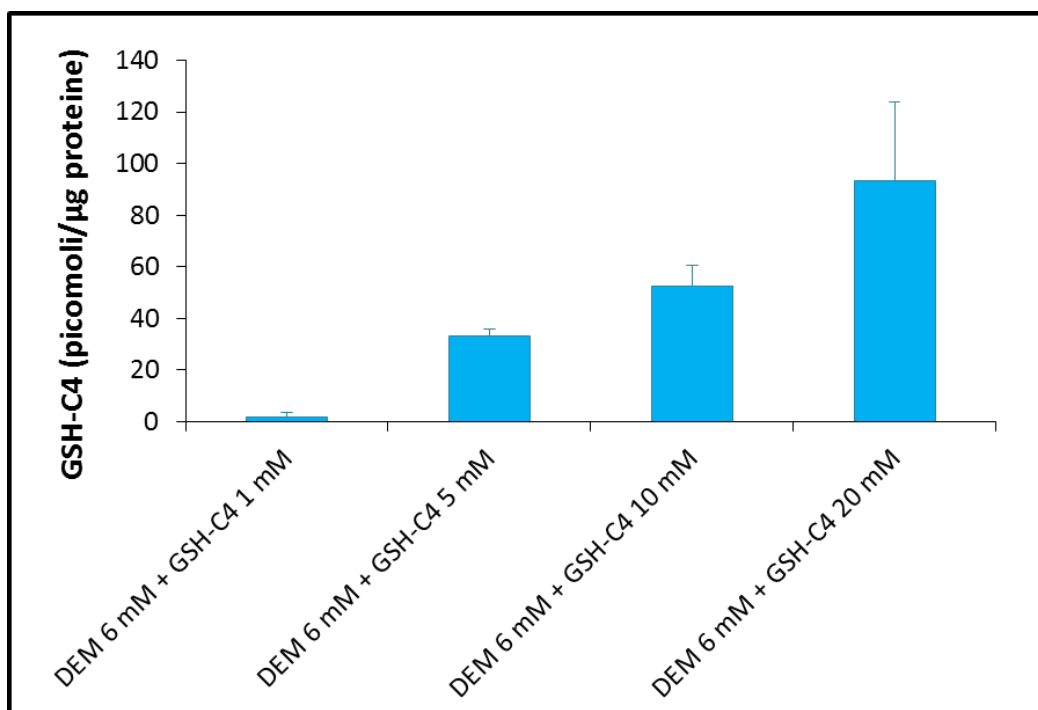


Figura 13. Livelli di GSH-C4 in cellule RAW 264.7 pre-trattate con DEM 6 mM per 15 minuti e successivamente trattate per 2 ore con GSH-C4 1, 5, 10 e 20 mM. Le cellule sono state poi utilizzate per la determinazione delle varie specie tioliche tramite HPLC come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. I risultati rappresentano la media \pm DS di almeno tre esperimenti condotti separatamente.

4.3 Studio della risposta immunitaria e dello stato redox in topi infettati con il complesso retrovirale LP-BM5

L'infezione causata dal complesso retrovirale LP-BM5 provoca una profonda immunodeficienza in topi C57BL/6. Tale patologia, chiamata comunemente AIDS murina (MAIDS) è caratterizzata da: una precoce attivazione delle cellule policlonali T e B, splenomegalia, linfadenopatia, ipergammaglobulinemia, diminuzione delle risposte immunitarie da parte delle cellule T e B, maggiore suscettibilità ai patogeni opportunisti e lo sviluppo nelle fasi avanzate della patologia di linfomi e disfunzioni neurologiche. Per valutare se un'eventuale deplezione di GSH potesse essere coinvolta nella progressione del MAIDS, topi C57BL/6 sono stati infettati con il complesso retrovirale LP-BM5 e a 2, 5 e 9 settimane dall'infezione il contenuto di GSH e Cys è stato valutato in milza, linfonodi, pancreas e cervello di topi infettati e topi di controllo. Agli stessi tempi è stata studiata la risposta immunitaria e il profilo citochinico Th1/Th2.

Valutazione della progressione dell'infezione da LP-BM5

Per studiare la risposta immunitaria durante l'infezione da LP-BM5, topi C57BL/6 sono stati infettati con una carica virale inferiore a quella precedentemente utilizzata in altri esperimenti [117, 120, 135, 140, 141]. Tale carica inferiore ha fatto sì che i parametri quali splenomegalia, linfadenopatia e contenuto di DNA BM5d non fossero rilevabili nei primi tempi di analisi ma soltanto a 9 settimane dall'infezione (Tabella 3). In figura 14 sono mostrati invece i risultati dell'ipergammaglobulinemia che, a differenza degli altri parametri risultano leggermente più alti nei topi infettati rispetto ai topi di controllo già dopo due settimane. Questa differenza diventa più evidente dopo 5 settimane di infezione, ma risulta significativa dopo 9 settimane. L'andamento rispecchia i risultati già ottenuti in precedenza [117], sebbene i valori assoluti siano più bassi.

Tabella 3. Splenomegalia, linfadenopatia e contenuto di DNA BM5d in milza e linfonodi di topi infettati con il complesso retrovirale LP-BM5.

Topi	Peso milza (g)	Peso Linfonodi (g)	BM5d DNA (copie/100 ng DNA)	
			Linfonodi	Milza
Controllo	0.098 ± 0.008	0.038 ± 0.016	NQ	NQ
Infettato	0.167 ± 0.021	0.080 ± 0.008	72 ± 8	169 ± 7

Topi C57BL/6 sono stati infettati come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". Nove settimane dopo l'infezione 5 topi di controllo e 5 topi infettati sono stati sacrificati e i livelli di DNA BM5d in milza e linfonodi sono stati determinati come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". I risultati rappresentano la media ± DS di 5 valori. ND: non quantificabile.

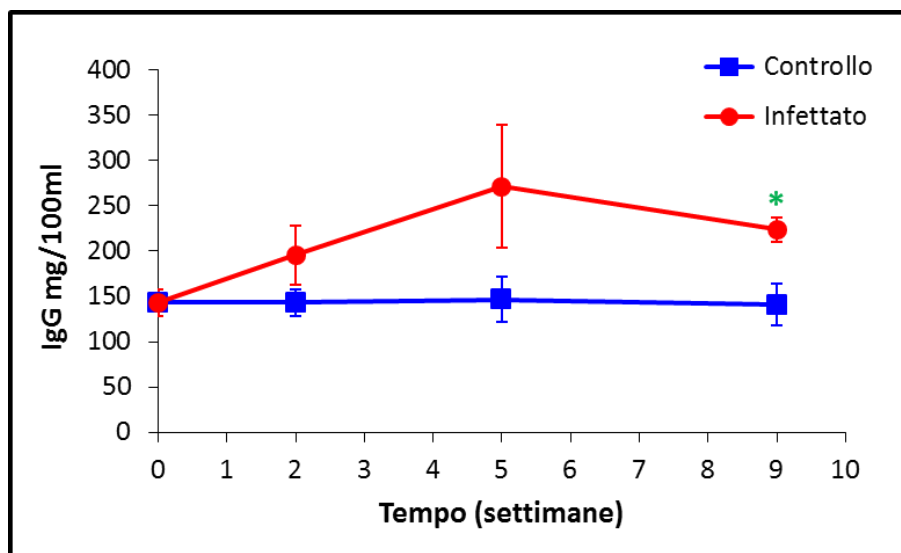


Figura 14. Contenuto di IgG in topi C57BL/6 infettati con il complesso retrovirale LP-BM5 (Infettato) e non infettati (Controllo). La concentrazione delle IgG è stata determinata su plasma prelevato da sangue intero come descritto in "Materiali e metodi" a 2, 5 e 9 settimane dall'infezione. Ciascun risultato rappresenta la media di 5 valori \pm DS. * $p \leq 0.05$.

Valutazione della risposta immunitaria Th1/Th2

Livelli di IgE nel plasma di topi infettati con LP-BM5

I livelli di IgE dopo 2 e 5 settimane dall'infezione sono riportati in Fig. 15. Possiamo notare che in entrambi i tempi i topi infettati hanno livelli più elevati di IgE in circolo in accordo con i dati presenti in letteratura [142]. A 9 settimane dopo l'infezione non si sono riscontrate differenze significative tra controlli ed infettati (dati non mostrati).

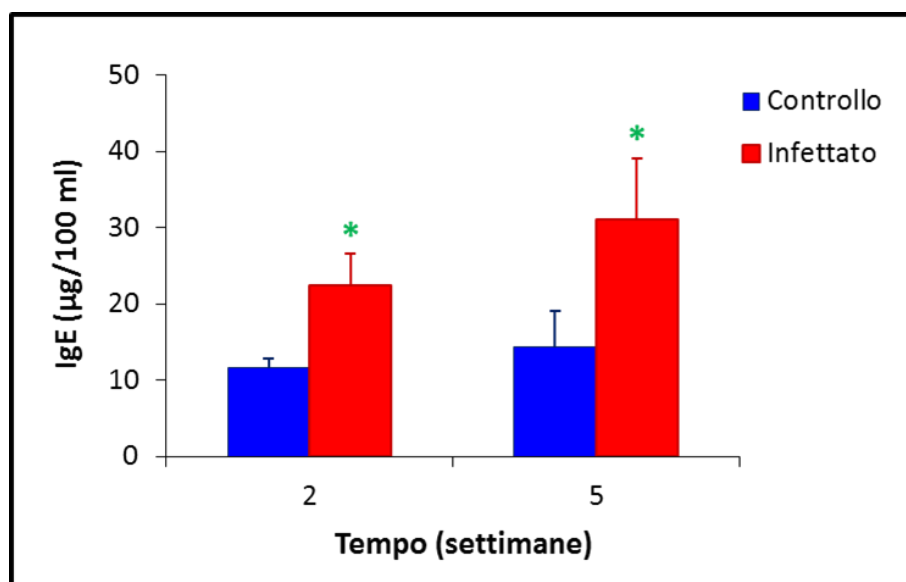


Figura 15. Contenuto di IgE in topi C57BL/6 infettati con il complesso retrovirale LP-BM5 (Infettato) e non infettati (Controllo). La concentrazione delle IgE è stata determinata su plasma come descritto nella sezione "Materiali e metodi". Ciascun risultato rappresenta la media di 5 valori \pm DS. * $p \leq 0.05$.

Espressione di citochine Th1/Th2 in topi infettati con LP-BM5

L'espressione di citochine Th1 (IL-12, IL-2 ed INF- γ) e Th2 (IL-5, IL-4 ed IL-10), così come del TNF- α e del GM-CSF, è stata studiata a 2, 5 e 9 settimane dall'infezione. A questo scopo sia le citochine secrete da parte degli splenociti che l'mRNA splenico ottenuti da topi infettati con LP-BM5 e da topi di controllo sono stati analizzati e i risultati sono mostrati in figura 16.

L'analisi quantitativa ha dimostrato che tutte le citochine erano rilevabili in tutti i topi analizzati. Nello specifico però possiamo notare come a 2 settimane dall'infezione la produzione dell'IL-5 nei topi infettati è circa 100 volte maggiore rispetto ai topi di controllo, quella dell'IL-4 e dell'IL-2 è circa 10 volte maggiore, mentre l'IL-10, l'IL-12 e l'INF- γ sono per lo più raddoppiate rispetto ai topi non infettati. Tutte le differenze trovate risultano significative da un punto di vista statistico. A 5 settimane dall'infezione gli splenociti di topi infettati producono: livelli di IL-5 40 volte più alti rispetto ai controlli; livelli di IL-4 15 volte più elevati rispetto ai controlli e livelli di IL-2 8 volte più elevati rispetto ai controlli; queste differenze risultano tutte significative. A questo tempo invece, i livelli di IL-10, IL-12 e INF- γ sono comparabili ai controlli. Nessuna differenza è riscontrabile per quanto riguarda i livelli del TNF- α e il GM-CSF che sia alle 2 che alle 5 settimane dall'infezione rimangono paragonabili ai controlli (figura 16a).

L'analisi in real-time PCR di cDNA delle milze di topi infettati con LP-BM5 e topi di controllo ha confermato, anche se in misura minore, l'andamento dei dati ottenuti dall'analisi della produzione di citochine. È interessante notare che i livelli di mRNA dell'IL-5 negli animali infettati sono significativamente più elevati rispetto ai topi di controllo a tutti i tempi analizzati (figura 16b).

A 9 settimane dall'infezione sono stati ottenuti risultati comparabili a quelli delle 5 settimane (dati non mostrati).

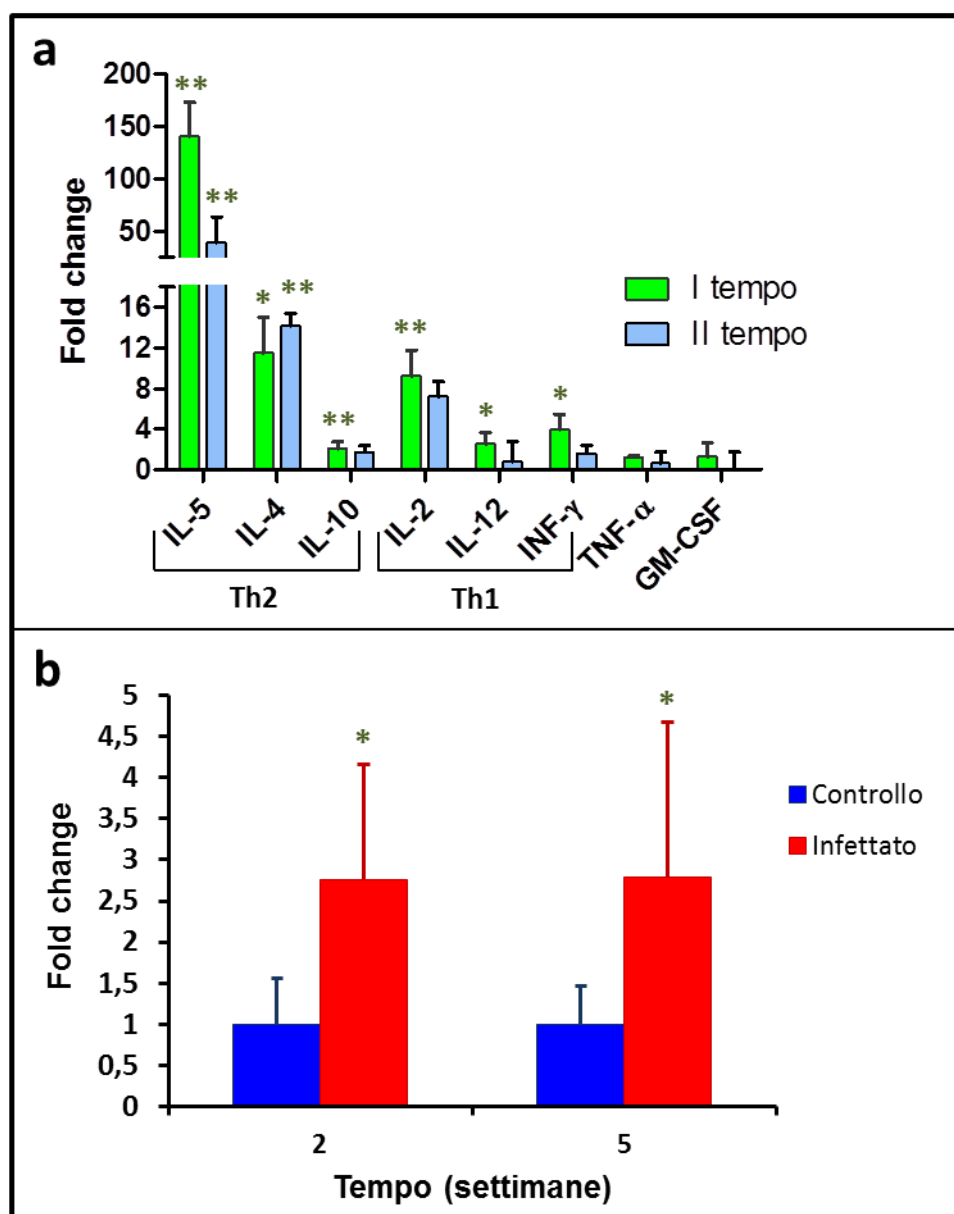


Figura 16. a: Livelli delle citochine Th2 (IL-5, IL-4 ed IL-10) e Th1 (IL-12, IL-2 ed INF-γ), del TNF-α e del GM-CSF (a) in surnatanti di splenociti ottenuti da topi infettati con LP-BM5 e da topi di controllo come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. Le analisi sono state effettuate a 2 settimane (I tempo) e 5 settimane (II tempo) dall’infezione. Il fold change è stato calcolato dividendo il valore di ogni citochina espressa in pg/mL di ogni topo infettato per il valore medio della corrispondente citochina dei topi non infettati. Ciascun risultato rappresenta la media di 5 valori \pm DS. * $p \leq 0.05$. e ** $p \leq 0.01$ Infettato vs Controllo. **b:** Espressione genica dell’IL-5. Il fold change rispetto al controllo non infettato è stato calcolato utilizzando il metodo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ con la normalizzazione dei dati grezzi sul gene housekeeping GAPDH. L’analisi dei dati è stata effettuata utilizzando il software di analisi RT2 Profiler PCR Array (SABiosciences). I valori rappresentano la media di 3 animali. Le barre di errore rappresentano il 95% di intervallo di confidenza. * $p \leq 0.05$.

Contenuto tiolico in organi di topi infettati con LP-BM5

Per valutare se l'infezione da LP-BM5 causa una deplezione del GSH, come già osservato in altre infezioni virali [40, 41, 46, 50, 51], i livelli di Cys e di GSH sono stati quantificati in milza, linfonodi, pancreas e cervello di topi infettati e topi di controllo, come descritto nella sezione "Materiali e Metodi" (figura 17). In tutti gli organi di topi infettati con LP-BM5 è stata riscontrata una deplezione significativa del GSH e/o della Cys.

Esaminando nei dettagli i risultati ottenuti possiamo osservare che nella milza degli infettati, sia il GSH che la Cys risultano alterati (Fig. 17a): alla quinta settimana si può osservare un calo nella concentrazione del GSH, che diventa ancora più evidente alla nona settimana dall'infezione. Tale diminuzione è avvalorata dallo studio statistico, risulta infatti essere molto significativa sia alla quinta settimana ($p=0,008$) che alla nona settimana ($p=0,004$). La Cys invece è significativamente più bassa rispetto ai controlli già dalla seconda settimana e continua a diminuire fino a discostarsi in modo molto significativo alla quinta ($p=0,001$) e alla nona settimana ($p=0,0048$).

Nei linfonodi (Fig. 17b) sia alla quinta ($p=0.0147$) che alla nona settimana ($p=0.0176$) dall'infezione vi è una diminuzione molto significativa del GSH negli infettati. La Cys risulta essere a concentrazioni più basse già alla seconda settimana e per i tempi successivi.

Nel pancreas (Fig. 17c) invece la situazione si presenta diversa in quanto non ci sono differenze significative nella concentrazione del GSH, mentre la concentrazione di Cys è più bassa sia a 5 che a 9 settimane, tale differenza è significativa alle 5 settimane.

Nel cervello (Fig. 17d) il contenuto di GSH è risultato essere significativamente più basso rispetto ai topi di controllo dopo 5 settimane dall'infezione.

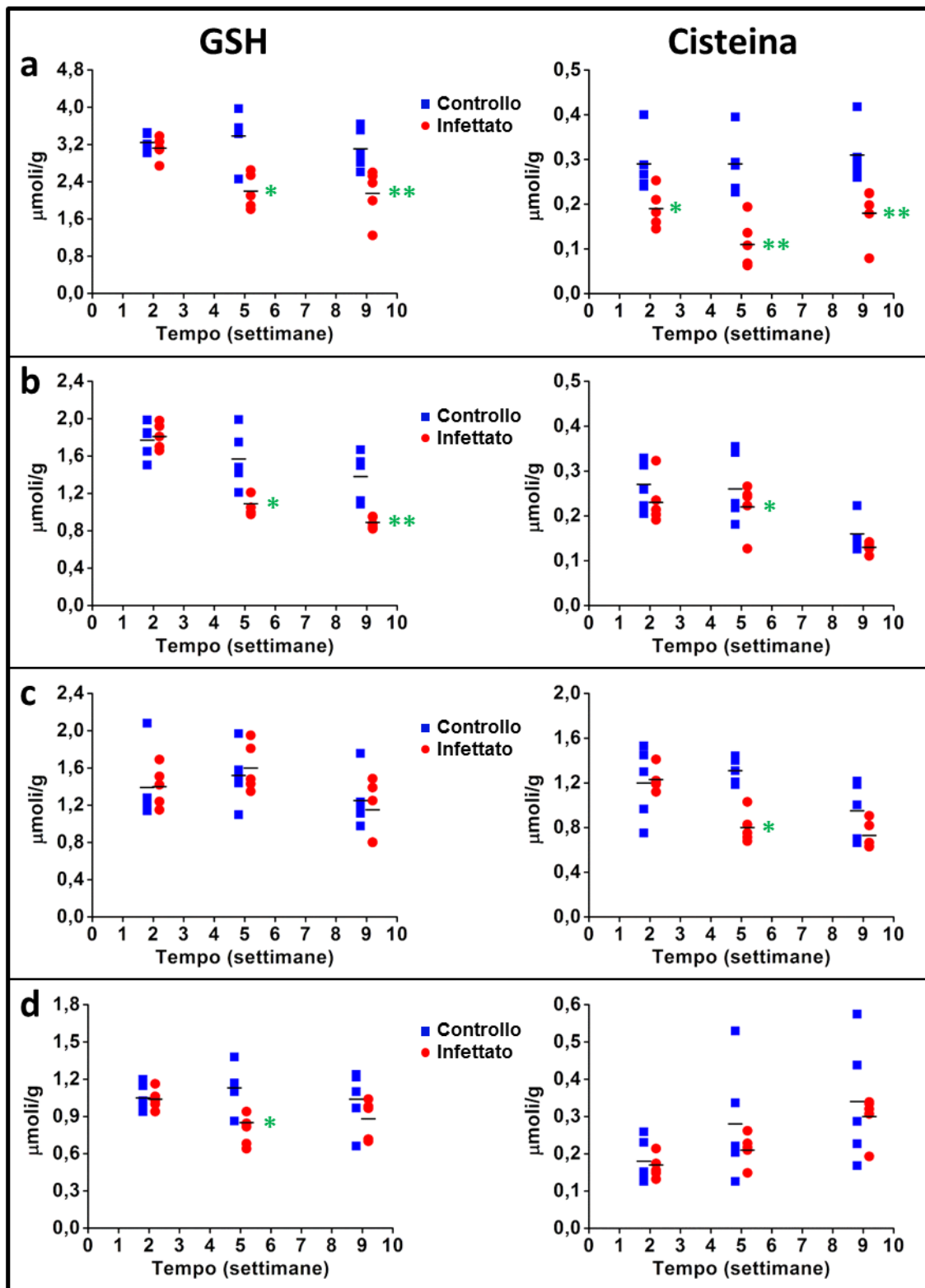


Figura 17. Contenuto di GSH (sinistra) e di Cisteina (destra) in milza (a), linfonodi (b), pancreas (c) e cervello (d) di topi di controllo (quadrati blu) e topi infettati (cerchi rossi) a 2, 5 e 9 settimane dopo l'inoculazione del virus. I topi sono stati infettati e il GSH e la Cys sono stati quantificati come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". I valori rappresentano la media \pm DS di 5 animali. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ Infettati vs Controlli dello stesso tempo.

Contenuto tiolico e livelli di espressione dell'mRNA di IL-12 p40 in macrofagi peritoneali murini infettati con il complesso retrovirale LP-BM5

Per approfondire il rapporto tra il contenuto tiolico intracellulare e la produzione di citochine Th1 (IL-12) durante le prime fasi dell'infezione, macrofagi peritoneali murini sono stati infettati *in vitro* con il complesso retrovirale LP-BM5. Dopo 3 e 6 giorni dall'infezione, sono stati analizzati il contenuto intracellulare del GSH e della Cys così come i livelli di espressione dell'mRNA di IL-12p40. Come riportato in tabella 4, in entrambi i tempi studiati i livelli di mRNA di IL-12p40 sono down-regolati nei macrofagi infettati rispetto ai macrofagi di controllo, raggiungendo una significativa inibizione a 6 giorni dall'infezione (Figura 18a). La concentrazione del GSH così come quella della Cys risulta invece significativamente più bassa sia a 3 che a 6 giorni dall'infezione nei macrofagi peritoneali infettati (Fig. 18b).

Tabella 4. *Contenuto di BM5d DNA e di IL-12p40 mRNA in macrofagi peritoneali murini infettati in vitro con il complesso retrovirale LP-BM5*

Tempo di infezione	BM5d DNA (copie/100 ng DNA)
3 giorni	35 ± 5
6 giorni	50 ± 5

*I macrofagi peritoneali sono stati ottenuti mediante lavaggio peritoneale ed infettati in vitro come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". Dopo 3 e 6 giorni dall'infezione il contenuto di BM5d DNA e l'espressione di IL-12 p40 mRNA sono stati analizzati come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". Le percentuali dell'IL-12 p40 mRNA sono state calcolate rispetto ai macrofagi non infettati. I valori rappresentano la media ± DS di 3 esperimenti indipendenti. *p<0,05.*

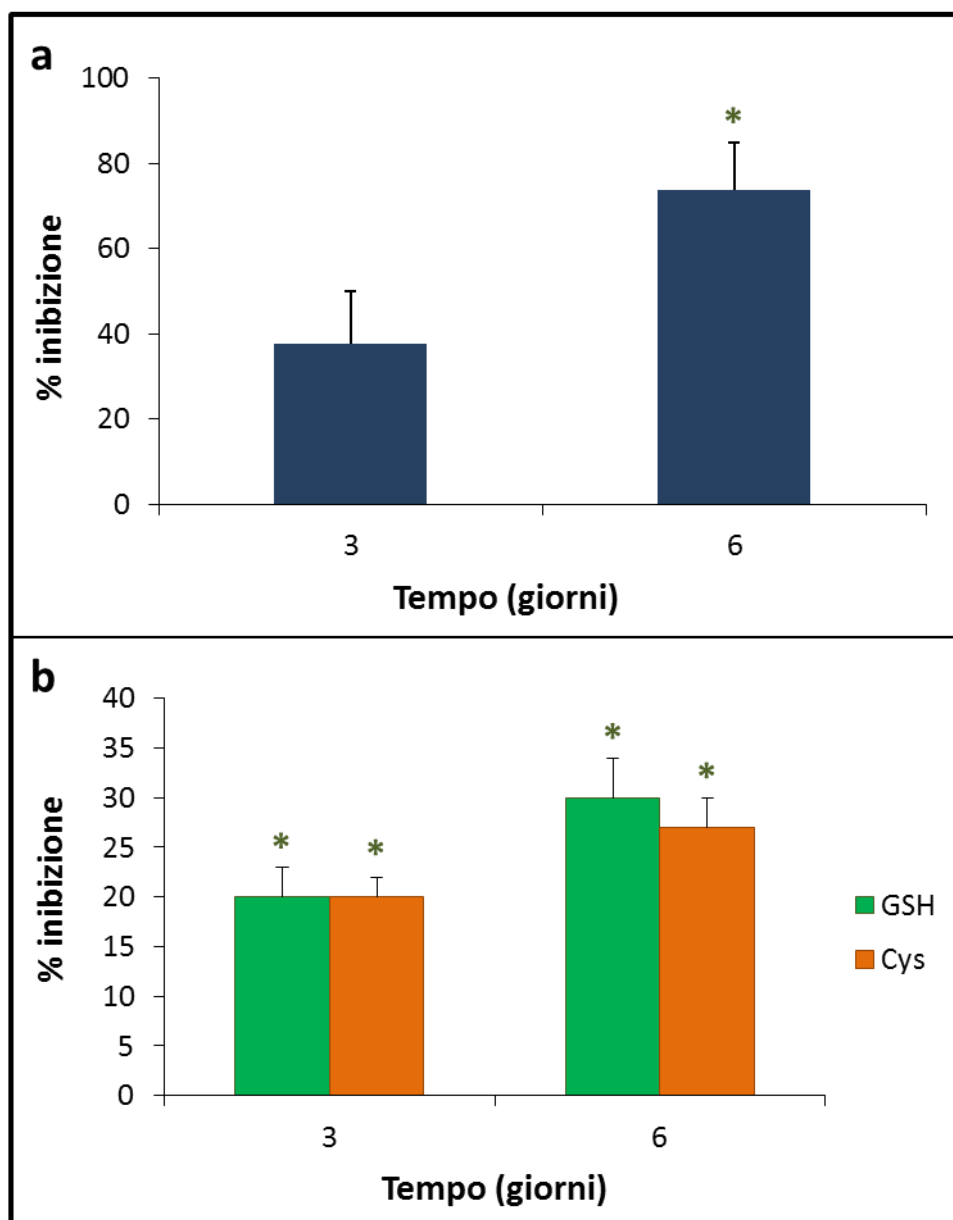


Figura 18. Contenuto di IL-12p40 mRNA (a) e di GSH e Cys (b) in macrofagi peritoneali murini infettati in vitro con il complesso retrovirale LP-BM5. I macrofagi peritoneali sono stati ottenuti mediante lavaggio peritoneale ed infettati in vitro come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". Dopo 3 e 6 giorni dall'infezione il contenuto di IL-12p40 mRNA, GSH e Cys è stato quantificato come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". Le percentuali di inibizioni sono state calcolate rispetto ai macrofagi non infettati. I valori rappresentano la media \pm DS di 3 esperimenti indipendenti. * $p < 0,05$.

4.4 Capacità di I-152 e GSH-C4 di aumentare il contenuto tiolico in milza, linfonodi, pancreas e cervello di topi C57BL/6

Avendo riscontrato una deplezione di GSH e/o Cys negli organi di topi infettati con LP-BM5, si è pensato di utilizzare il GSH-C4 e l'I-152 per il loro ripristino. Il primo obiettivo era quello di valutare la capacità di tali molecole o dei loro metaboliti di raggiungere gli organi bersaglio, ossia quelli in cui si è verificata una deplezione del GSH e/o Cys in seguito ad infezione con il complesso retrovirale LP-BM5. A tal fine, topi C57BL/6 non infettati sono stati trattati con I-152 o con GSH-C4 come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". In seguito alla somministrazione intraperitoneale delle due molecole sono state quantificate le diverse specie tioliche in milza, linfonodi, pancreas e cervello a diversi tempi (30, 60, 240 minuti). Inoltre è stata valutato il tempo di scomparsa di entrambe le molecole dal circolo.

Contenuto tiolico in plasma e organi di topi C57BL/6 trattati con I-152

Analizzando il plasma di topi trattati con l'I-152, si può notare che la concentrazione più alta di I-152 in circolo (0.14 ± 0.01 $\mu\text{mol/L}$ plasma) si ha dopo 15 minuti dalla sua somministrazione (Figura 19). Inoltre, i prodotti del metabolismo della molecola, NAC e cisteammina, sono quantificabili a tutti i tempi investigati, con il picco di concentrazione per la NAC a 15 minuti (0.14 ± 0.01 $\mu\text{mol/L}$ plasma) e per la cisteammina a 30 minuti (0.04 ± 0.003 $\mu\text{mol/L}$ plasma) (figura 19).

In seguito alla somministrazione di I-152, si può osservare che in tutti gli organi testati la molecola è del tutto assente, mentre i suoi metaboliti, quali NAC e cisteammina raggiungono la concentrazione più elevata dopo 30 minuti in milza, linfonodi e pancreas. Nel cervello invece abbiamo un diverso andamento dei due metaboliti: mentre le più alte concentrazioni della cisteammina sono riscontrate dopo 30 minuti quelle della NAC si evidenziano a 60 minuti (Tabella 5). A 240 minuti i metaboliti non sono più riscontrabili nei vari organi analizzati, eccetto per la NAC ancora presente nei linfonodi e nel cervello (Tabella 5).

Negli stessi organi sono stati quantificati anche il GSH e la Cys. Il contenuto del tripeptide è rimasto invariato in tutti gli organi analizzati, eccetto nei linfonodi dove si riscontra una diminuzione significativa dopo 30 minuti dalla somministrazione della molecola, tuttavia nei tempi successivi, i livelli del GSH tornano ad essere comparabili a quelli dei controlli (figura 20). I livelli di Cys invece, sono aumentati in tutti gli organi analizzati, aumento che risulta significativo nei linfonodi a 30 e 60 minuti e nel cervello a 30 minuti dal trattamento con l'I-152.

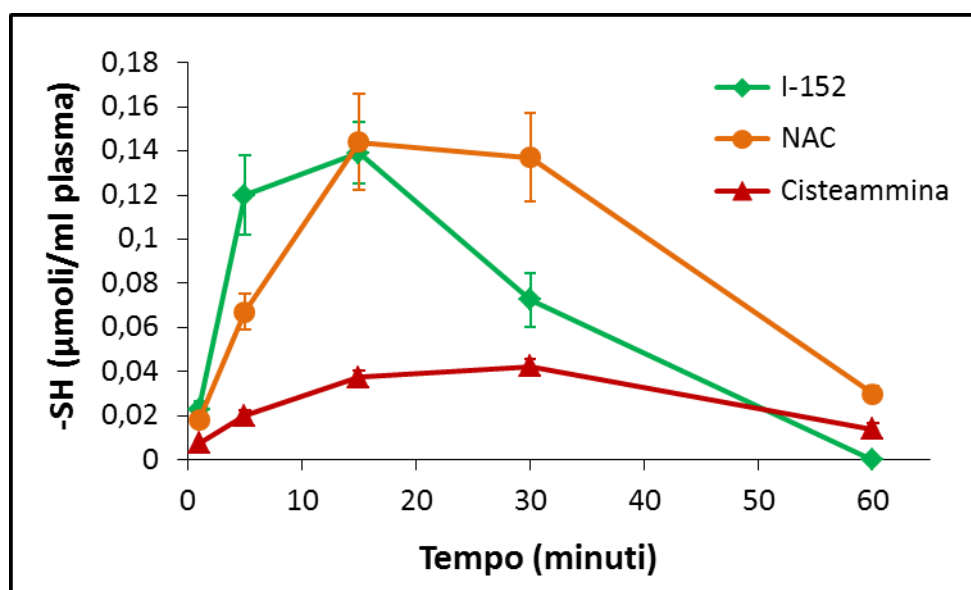


Figura 19. Contenuto di I-152 e dei suoi metaboliti (NAC e cisteammina) in plasma di topi C57BL/6. L'I-152 è stata somministrato come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". Le diverse specie tioliche sono state quantificate tramite HPLC come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". I valori sono la media \pm DS di 3 topi.

Tabella 5. Contenuto di NAC e cisteammina in milza, linfonodi, pancreas e cervello di topi C57BL/6 trattati con I-152.

Organo	30 min ($\mu\text{moli/g}$ organo)		60 min ($\mu\text{moli/g}$ organo)		240 min ($\mu\text{moli/g}$ organo)	
	NAC	Cisteammina	NAC	Cisteammina	NAC	Cisteammina
Milza	1.00 ± 0.19	0.26 ± 0.05	0.42 ± 0.34	0.19 ± 0.03	NQ	NQ
Linfonodi	0.83 ± 0.13	0.29 ± 0.07	0.23 ± 0.09	0.17 ± 0.05	0.20 ± 0.07	NQ
Pancreas	0.24 ± 0.03	0.22 ± 0.03	NQ	0.14 ± 0.02	NQ	NQ
Cervello	0.11 ± 0.01	0.07 ± 0.01	0.21 ± 0.01	NQ	0.035 ± 0.01	NQ

La somministrazione dell'I-152 e la determinazione dei suoi metaboliti negli organi è stata effettuata come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". I valori rappresentano la media \pm DS di 3 topi. NQ: non quantificabile.

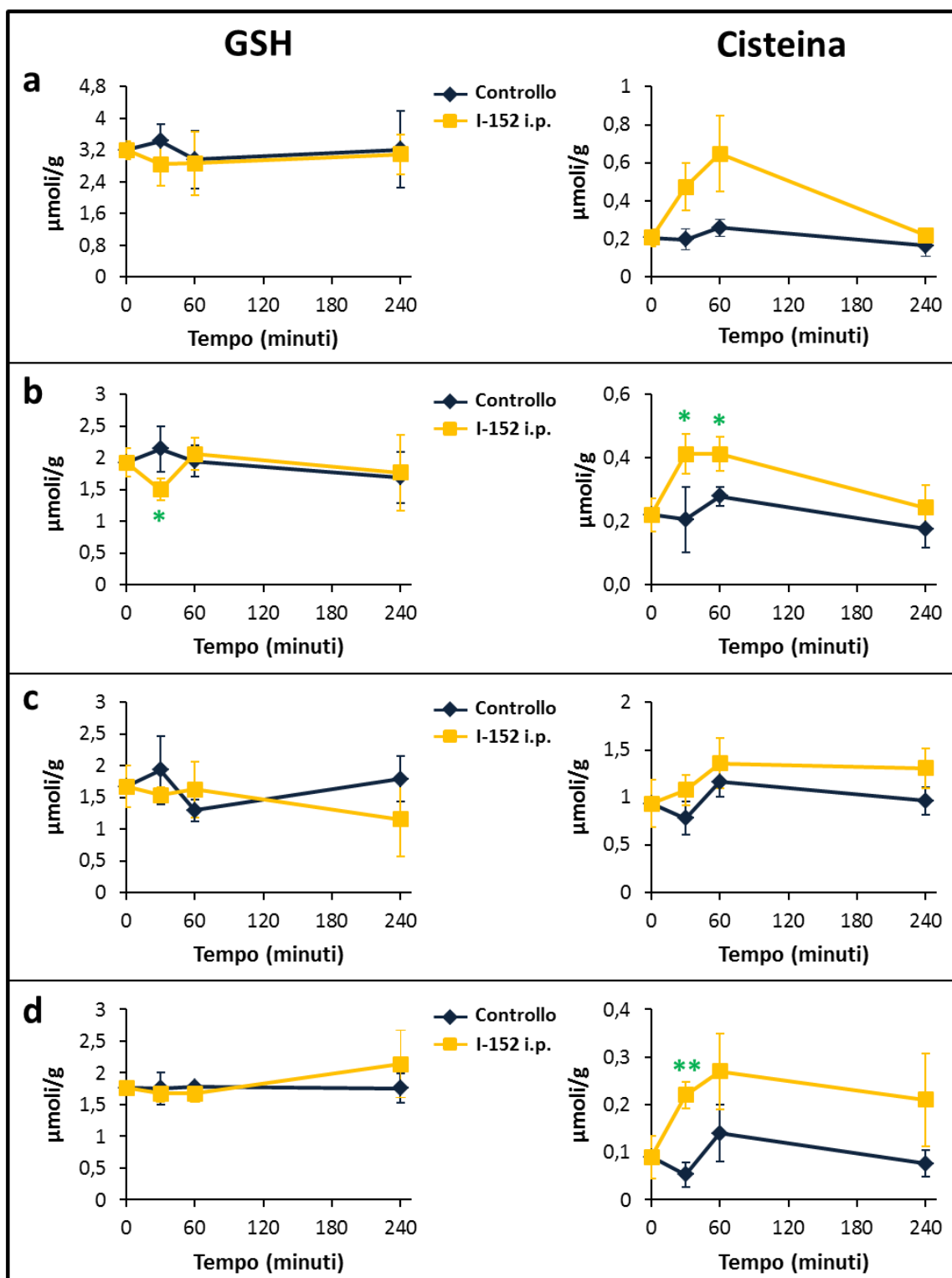


Figura 20. Livelli di GSH e Cisteina in organi di topi trattati con I-152. La figura mostra i livelli di GSH e Cys in milza (a), linfonodi (b), pancreas (c) e cervello (d) di topi non trattati (controllo) e di topi trattati intraperitonealmente (i.p.) con $32.5 \mu\text{moli}$ di I-152 (I-152 i.p.). Il GSH e la Cys sono stati determinati dopo 30, 60 e 240 minuti dalla somministrazione della molecola seguendo la procedura descritta nella sezione "Materiali e Metodi". I valori rappresentano la media \pm DS di 3 animali. * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ I-152 i.p. vs controllo dello stesso tempo.

Contenuto tiolico in plasma e organi di topi C57BL/6 trattati con GSH-C4

Il plasma di topi trattati con il GSH-C4 ha mostrato il picco di concentrazione della molecola ($3.5 \pm 0.3 \mu\text{mol/L}$ plasma) dopo 5 minuti dalla sua somministrazione (figura 21), mentre nei tempi successivi si nota la progressiva diminuzione, fino a 60 minuti, tempo in cui la molecola è del tutto assente.

Le analisi condotte in milza, linfonodi e pancreas hanno mostrato che i più alti livelli di GSH-C4 si riscontrano dopo 30 minuti dalla sua somministrazione, mentre nel cervello il picco è rilevabile dopo 60 minuti (tabella 6). Dopo 240 minuti il GSH-C4 è determinabile nel pancreas e nella milza di un solo topo su tre trattato con la molecola (tabella 6), mentre è del tutto assente nei linfonodi e nel cervello.

I livelli intracellulari di GSH e Cys, in seguito a somministrazione intraperitoneale del GSH-C4 sono riportati in figura 22. Nella milza il trattamento ha causato un aumento dei livelli di GSH dopo 240 minuti, mentre nei linfonodi non si evidenziano differenze significative in entrambe le specie tioliche prese in esame. Nel pancreas possiamo osservare che la somministrazione di GSH-C4 ha causato un aumento significativo dei livelli di GSH e una significativa diminuzione dei livelli di Cys a 30 minuti, mentre nei tempi successivi, sia la concentrazione di GSH che quella della Cys sono paragonabili a quelle dei controlli. Infine, l'analisi del contenuto tiolico nel cervello ha evidenziato un aumento molto significativo del contenuto di GSH dopo 60 minuti, mentre non si riscontrano effetti sui livelli di Cys.

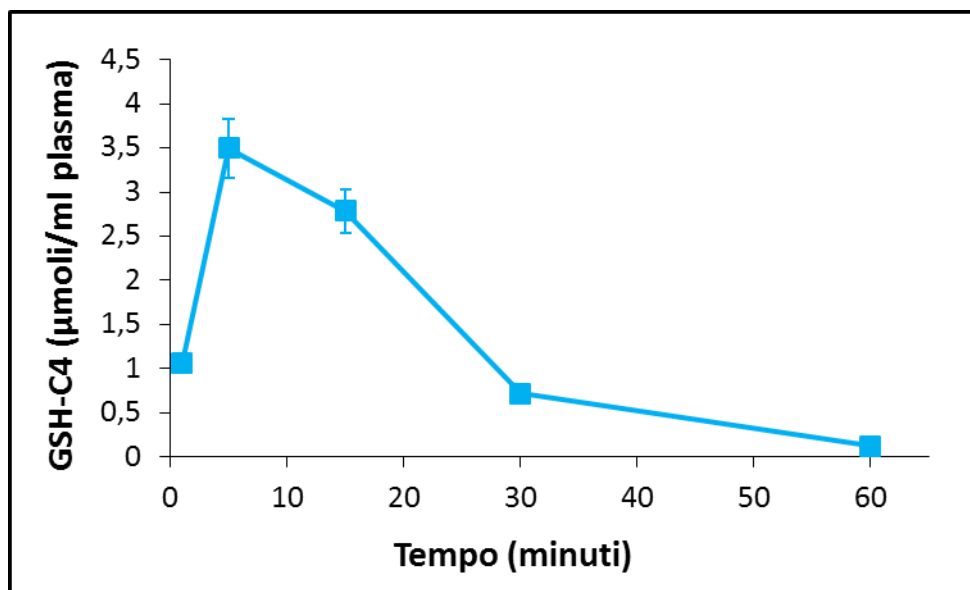


Figura 21. Contenuto di GSH-C4 in plasma di topi C57BL/6. Il GSH-C4 è stato somministrato e quantificato mediante HPLC come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". I valori sono la media \pm DS di 3 topi.

Tabella 6. Contenuto di GSH-C4 in milza, linfonodi, pancreas e cervello di topi C57BL/6 trattati con il GSH-C4.

Organo	30 min ($\mu\text{mol/g}$ organo)	60 min ($\mu\text{mol/g}$ organo)	240 min ($\mu\text{mol/g}$ organo)
Milza	0.650 ± 0.240	0.180 ± 0.010	0.051^*
Linfonodi	0.220 ± 0.050	0.080 ± 0.030	NQ
Pancreas	0.560 ± 0.140	0.290 ± 0.140	0.030 ± 0.010
Cervello	0.030 ± 0.001	0.060 ± 0.009	NQ

Il GSH-C4 è stato somministrato come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". I valori sono la media \pm DS di 3 topi. * Solo un valore è riportato. NQ: non quantificabile.

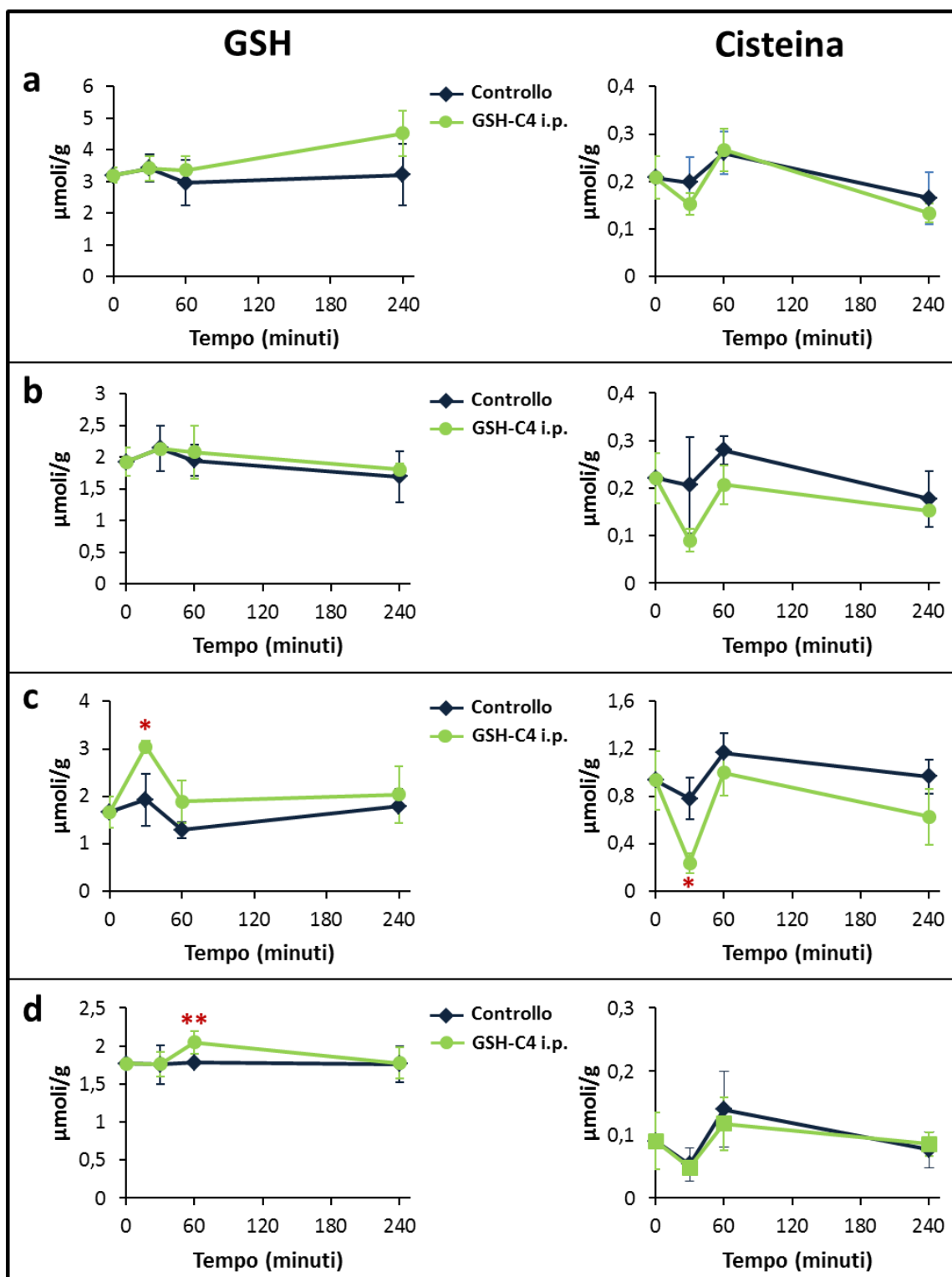


Figura 22. Livelli di GSH e Cisteina in organi di topi trattati con il GSH-C4. La figura mostra i livelli di GSH e Cys in milza (a), linfonodi (b), pancreas (c) e cervello (d) di topi non trattati (controllo) e di topi trattati intraperitonealmente (i.p.) con 32,5 μmoli di GSH-C4 (GSH-C4 i.p.). Il GSH e la Cys sono stati determinati dopo 30, 60 e 240 minuti dalla somministrazione della molecola seguendo la procedura descritta nella sezione "Materiali e Metodi". I valori rappresentano la media \pm DS di 3 animali. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$ GSH-C4 i.p. vs controllo dello stesso tempo.

4.5 Modulazione della risposta immunitaria in topi infettati con il complesso retrovirale LP-BM5 e trattati con I-152 o GSH-C4

Appurato che l'infezione da LP-BM5 è caratterizzata da una prevalenza della risposta immunitaria di tipo Th2 (Figura 16) e da uno squilibrio dello stato redox dovuto ad una deplezione del GSH e/o della Cys (Figura 17), e dimostrato che il GSH-C4 e l'I-152 possono aumentare il contenuto tiolico nei vari organi, si è pensato di poter modulare la risposta immunitaria intervenendo sullo stato redox intraorgano tramite trattamento con l'I-152 ed il GSH-C4.

A questo scopo, topi C57BL/6 infettati con l'LP-BM5 sono stati trattati con GSH-C4 o I-152 come descritto nella sezione "Materiali e Metodi" e a 2, 5 e 9 settimane dall'infezione sono stati studiati il profilo citochinico così come la splenomegalia e la linfadenopatia.

Splenomegalia, linfadenopatia e DNA BM5d

L'analisi di splenomegalia e linfadenopatia in topi C57BL/6 infettati con l'LP-BM5 e trattati con I-152 e GSH-C4 è mostrata in figura 23. Il trattamento con I-152 ha mostrato una diminuzione significativa nel peso dei linfonodi e della milza sia a 5 che a 9 settimane rispetto ai topi infettati e non trattati. Il trattamento con il GSH-C4 invece non ha mostrato differenze significative (Figura 23).

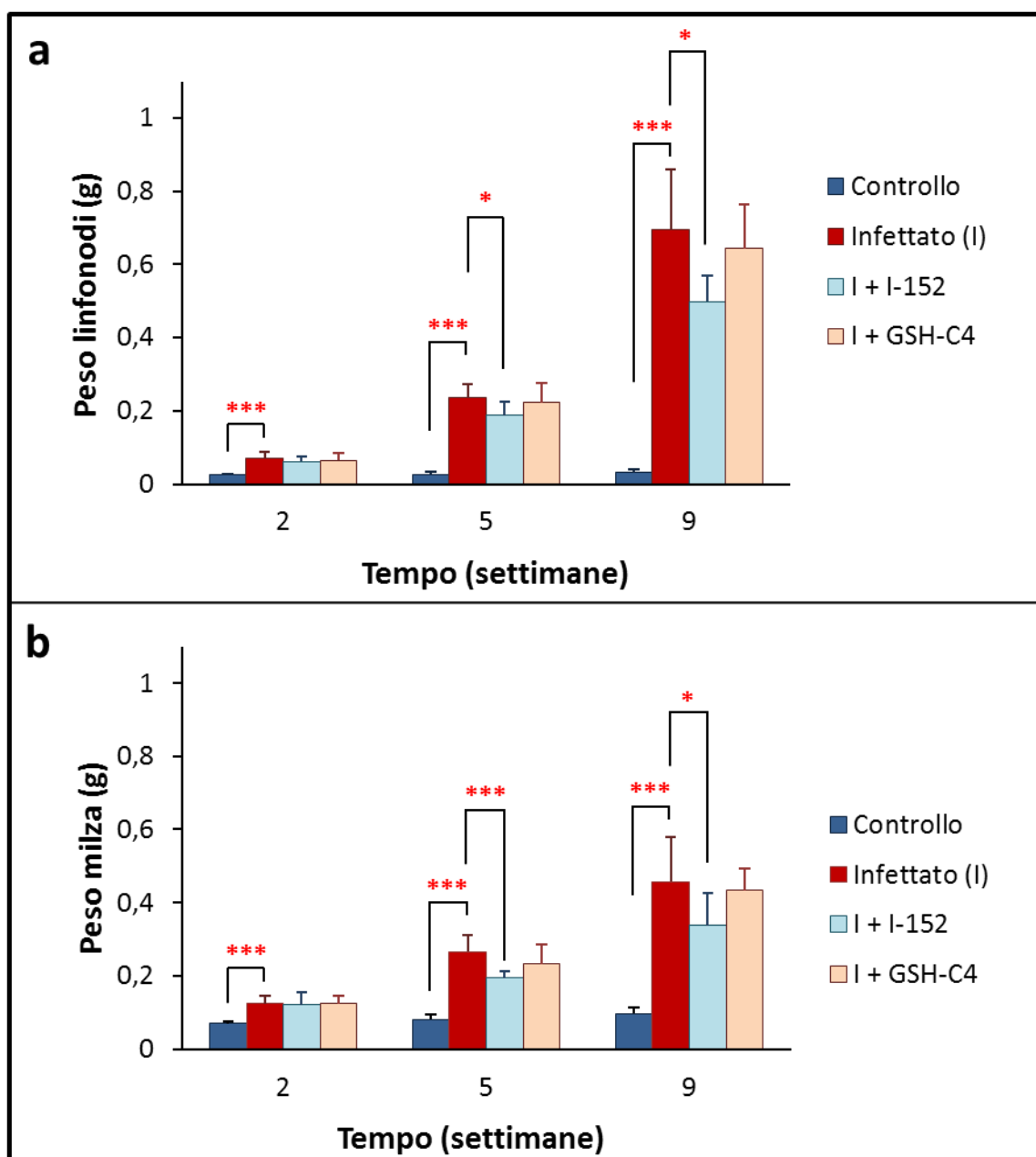


Figura 23. Linfadenopatia (a) e splenomegalia (b) in topi C57BL/6 infettati con LP-BM5 e trattati con I-152 o GSH-C4. I Topi sono stati infettati e trattati con le molecole come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. Due, 5 e 9 settimane dopo l'infezione sono stati sacrificati 8 topi per ogni gruppo e il peso dei linfonodi e della milza è stato determinato. I topi infettati e trattati con il placebo sono stati sommati al gruppo dei topi infettati [Infettato (I)] non avendo mostrato differenze significative con tale gruppo. I risultati rappresentano la media \pm DS di almeno 8 valori. * $p \leq 0.05$; *** $p \leq 0.005$.

Livelli di citochine Th1/Th2 in topi infettati con il complesso retrovirale LP-BM5 e trattati con I-152 o GSH-C4

La produzione di citochine Th1 (IL-12, IL-2 ed INF- γ) e Th2 (IL-5, IL-4 ed IL-10), e del TNF- α , in surnatanti di splenociti ottenuti da topi infettati con LP-BM5 e da topi di controllo, è mostrata in figura 24. Come già osservato nell'esperimento preliminare (Figura 16), anche in questo caso è predominante la risposta immunitaria di tipo Th2 a tutti i tempi, seppur al terzo tempo (9 settimane) si riscontra un aumento anche della risposta Th1 (Figura 24) non rilevabile nella prima infezione. In particolare, a due settimane dall'infezione la produzione dell'IL-5 nei topi infettati risulta circa 300 volte maggiore rispetto ai topi di controllo, quella dell'IL-4 risulta essere circa 6 volte maggiore mentre la produzione dell'IL-10 è circa 3 volte maggiore. Tutte le differenze trovate sono significative da un punto di vista statistico. Dopo 5 settimane dall'inoculo del virus, le citochine che risultano significativamente diverse nei topi infettati rispetto ai topi di controllo sono sempre l'IL-5 e l'IL-4 che sono circa 70 volte più elevate nei topi infettati e l'IL-10 che risulta 4 volte maggiore rispetto ai topi di controllo. A 9 settimane dall'infezione la secrezione dell'IL-5, dell'IL-4 e dell'IL-10 risulta essere significativamente aumentata nei topi infettati rispetto ai topi di controllo di circa 12 volte. Allo stesso tempo l'IL-2 è circa un terzo nei topi infettati rispetto ai topi di controllo, mentre l'IL-12 e l'INF- γ sono più elevate nei topi infettati di circa 3 e 20 volte rispettivamente. Le differenze analizzate risultano significative da un punto di vista statistico.

Il trattamento con l'I-152 ha aumentato in modo significativo la produzione dell'INF- γ rispetto ai topi infettati a 2 settimane dall'infezione (I tempo) e diminuito in modo significativo la produzione dell'IL-5 e dell'IL-4 rispetto ai topi infettati a 5 settimane (II tempo) dall'infezione. Al terzo tempo (9 settimane), l'IL-12 risulta essere 2 volte più elevata nei topi trattati rispetto ai topi infettati seppur questa differenza risulta non abbastanza significativa ($p=0.0527$) (Figura 25a).

Il trattamento con il GSH-C4 ha mostrato differenze significative rispetto ai topi infettati nella produzione di IL-4 dopo 5 settimane dall'infezione che risulta essere più bassa, e nella produzione dell'IL-12, INF- γ e TNF- α , tutte circa 3 volte più elevate nei topi trattati rispetto ai topi infettati dopo 9 settimane dall'infezione (Figura 23b).

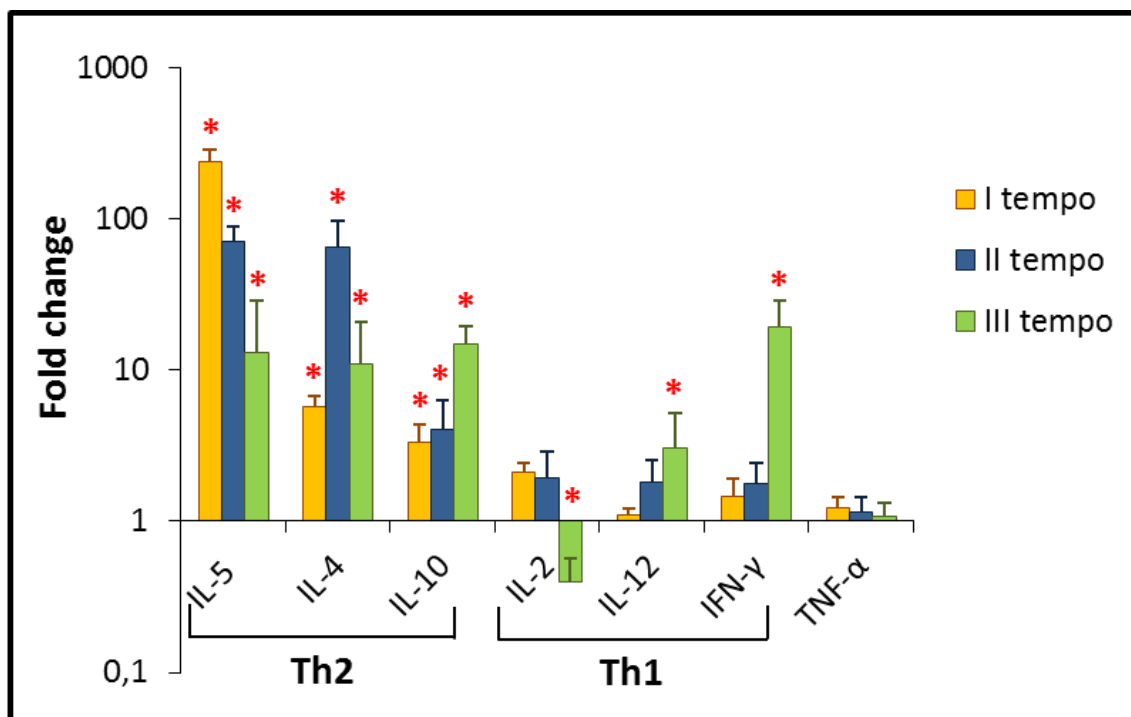


Figura 24. Livelli delle citochine Th2 (IL-5, IL-4 ed IL-10) e Th1 (IL-12, IL-2 ed IFN- γ), e del TNF- α in surnatanti di splenociti ottenuti da topi infettati con LP-BM5 e da topi di controllo come descritto nella sezione “Materiali e Metodi”. Le analisi sono state effettuate a 2 settimane (I tempo), 5 settimane (II tempo) e 9 settimane (III tempo) dall’infezione. Il fold change è stato calcolato dividendo il valore di ogni citochina espressa in pg/mL di ogni topo infettato per il valore medio della corrispondente citochina dei topi non infettati. Ciascun risultato rappresenta la media di 5 valori \pm DS. * $p \leq 0.05$.

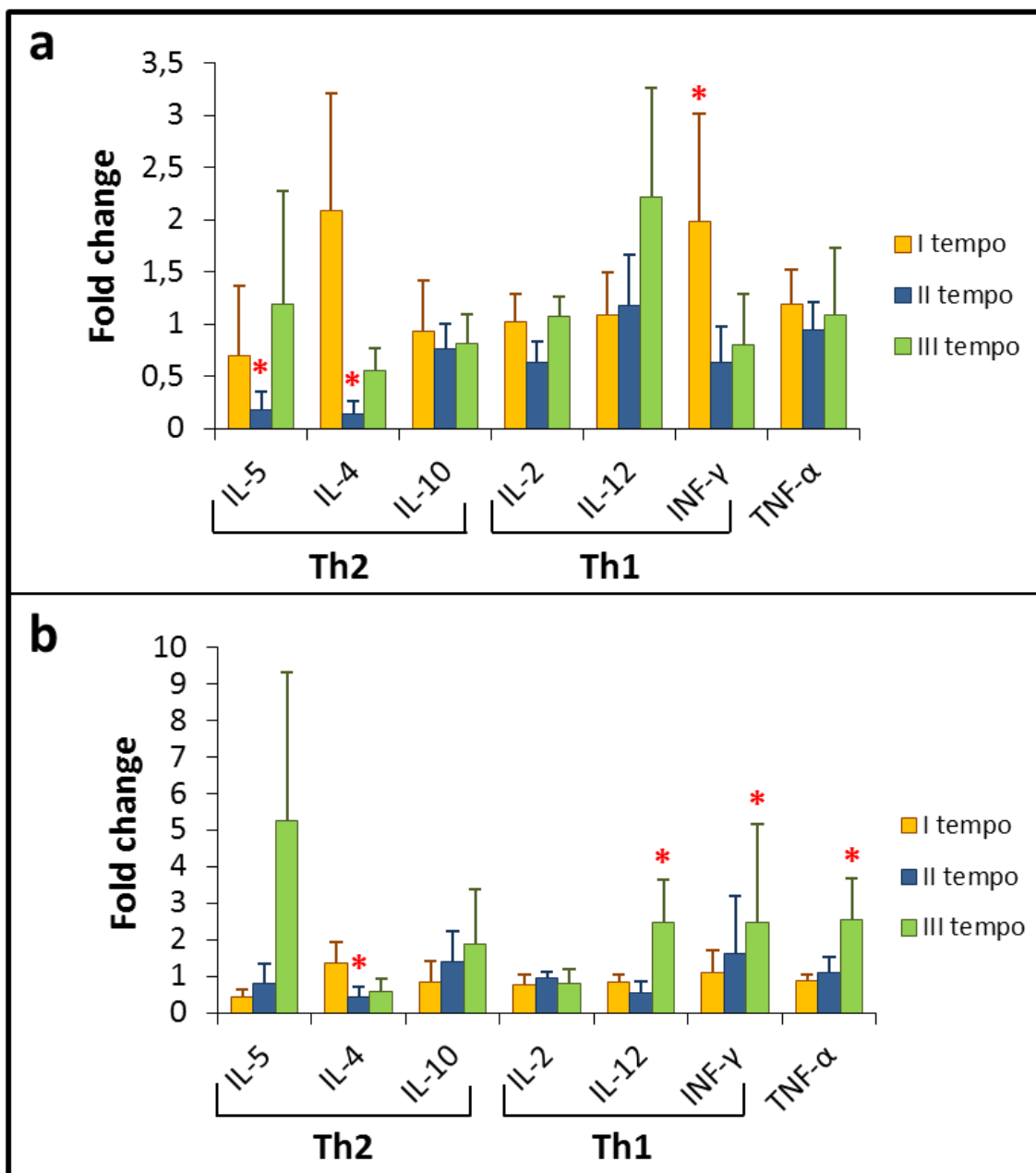


Figura 25. Livelli delle citochine Th2 (IL-5, IL-4 ed IL-10) e Th1 (IL-12, IL-2 ed INF-γ), e del TNF-α in surnatanti di splenociti ottenuti da topi infettati con LP-BM5 e trattati con l'I-152 (a) o con il GSH-C4 (b) come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". Le analisi sono state effettuate a 2 settimane (I tempo), 5 settimane (II tempo) e 9 settimane (III tempo) dall'infezione. I valori dei topi infettati trattati con il placebo sono stati sommati ai valori dei topi infettati non trattati non avendo mostrato differenze significative con tale gruppo. Il fold change è stato calcolato dividendo il valore di ogni citochina espressa in pg/mL di ogni topo trattato con I-152 o GSH-C4 per il valore medio della corrispondente citochina dei topi infettati. Ciascun risultato rappresenta la media di 5 valori \pm DS. * $p \leq 0.05$.

4.6 Studio dello stato redox intraorgano in topi BALB/c giovani ed anziani

Allo scopo di verificare che l'invecchiamento è caratterizzato da uno squilibrio dello stato redox, è stato analizzato il contenuto di GSH e Cys in milza, linfonodi, pancreas e polmoni di topi BALB/c giovani (2 mesi) ed anziani (14 mesi).

Contenuto tiolico intraorgano in topi BALB/c giovani ed anziani

Il contenuto di GSH e di Cys è stato valutato in milza, linfonodi, pancreas e polmoni in topi BALB/c come descritto nella sezione "Materiali e Metodi" ed i risultati sono mostrati in figura 26. In particolare possiamo notare come il GSH sia in concentrazione minore nei topi anziani rispetto ai topi giovani in tutti gli organi analizzati, in modo significativo nei linfonodi e nel pancreas (Figura 26°). La Cys invece, negli anziani, risulta più bassa nel pancreas e non è determinabile né nei linfonodi né nei polmoni (Figura 26b).

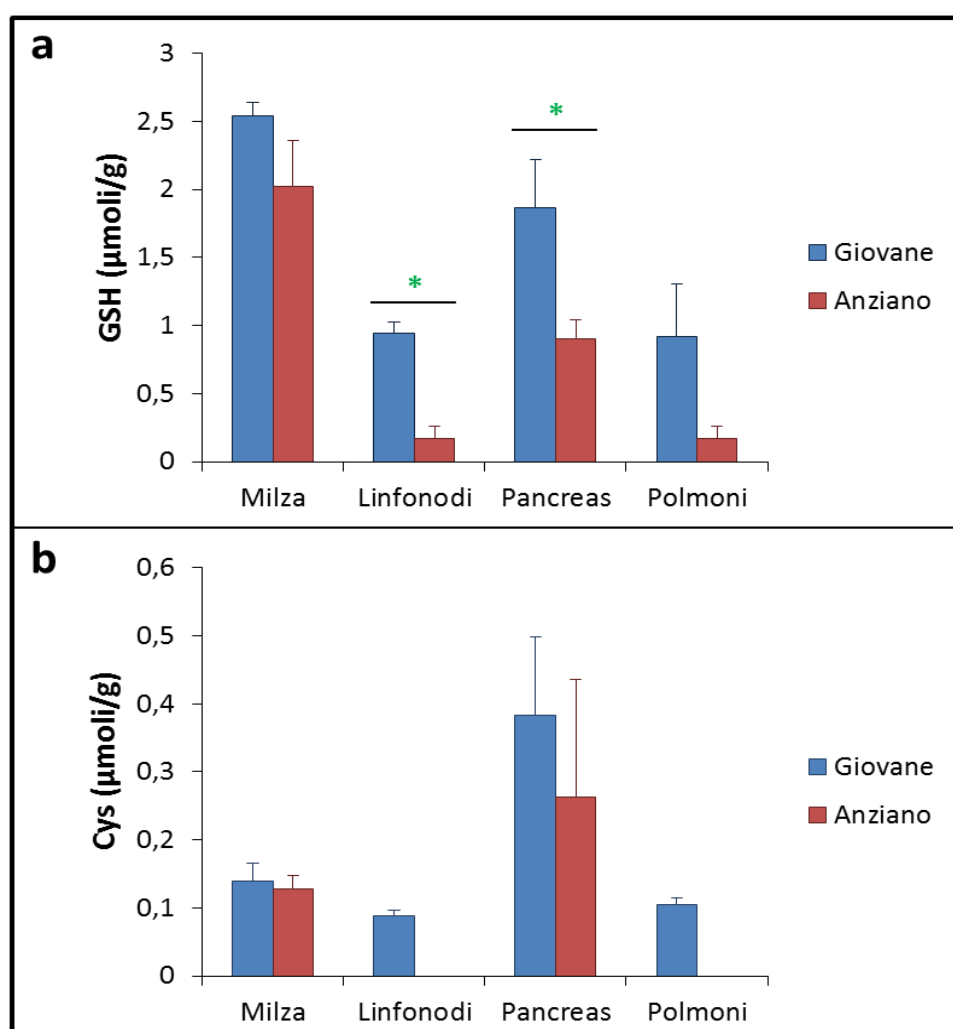


Figura 26. Livelli di GSH (a) e Cys (b) in organi di topi BALB/c giovani (2 mesi) ed anziani (14 mesi). Il GSH e la Cys sono stati determinati seguendo la procedura descritta nella sezione "Materiali e Metodi". I valori rappresentano la media \pm DS di 3 animali. * $p \leq 0.05$.

4.7 Modulazione della risposta immunitaria in topi infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati con il GSH-C4

Nella popolazione anziana è noto che la morbilità e la mortalità in seguito all'influenza è maggiore rispetto alla popolazione giovane, tuttavia, i meccanismi alla base della maggiore suscettibilità all'infezione non sono completamente noti. È stato suggerito che una delle cause possa essere lo spostamento nella produzione di citochine da quelle di tipo Th1 a quelle di tipo Th2 [143]. Inoltre è stato dimostrato una diminuzione dei livelli intracellulari di GSH e uno stress ossidativo generale in modelli *in vitro* ed *in vivo* del virus influenzale [54] e un'inibizione del titolo virale in seguito al trattamento con il GSH-C4 [132] in topi giovani. Dopo aver dimostrato il basso contenuto tiolico in organi di topo anziano (Figura 26), si è pensato di intervenire su di esso con il GSH-C4 per andare a modulare la risposta immunitaria in topi infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1, e verificare se anche in questo modello il trattamento potesse inibire la replicazione virale. Per perseguire tale scopo topi BALB/c di 14 mesi sono stati infettati e trattati con il GSH-C4 come descritto nella sezione "Materiali e Metodi".

Replicazione virale nei polmoni di topi anziani infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati con il GSH-C4

L'analisi del titolo virale nei polmoni ha evidenziato un'inibizione significativa della replicazione virale nei topi trattati con il GSH-C4 rispetto ai topi infettati e trattati con il placebo (Figura 27).

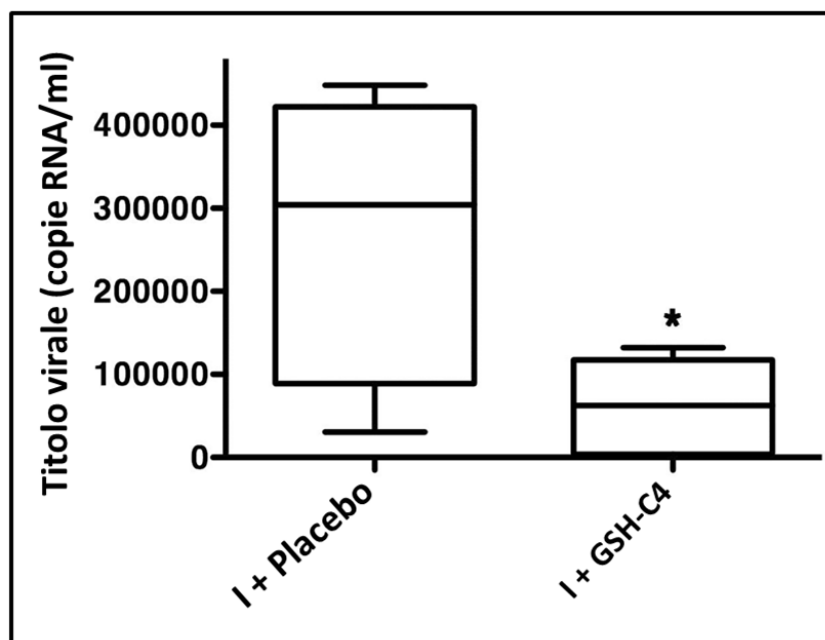


Figura 27. Topi BALB/c sono stati infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati con il GSH-C4 (I + GSH-C4) o con il placebo (I + Placebo) come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". Il titolo virale è stato determinato in omogenati di polmoni come descritto nella sezione "Materiali e Metodi" (n=5 topi/gruppo) * $p < 0.05$.

Livelli di citochine Th1/Th2 in topi infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati con il GSH-C4

La produzione di citochine Th2 (IL-4, IL-5 ed IL-10) e Th1 (IL-2, IL-12 ed INF- γ) è stata studiata dopo 8 giorni dall'inoculo nel lavaggio broncoalveolare di topi trattati con il placebo e di topi trattati con il GSH-C4. I risultati mostrati in figura 28 evidenziano come il trattamento con il GSH-C4 tende a ridurre la produzione delle citochine Th2 rispetto al trattamento con il placebo. Allo stesso tempo, il trattamento stimola la produzione dell'IL-2 e dell'IL-12, in maniera significativa per quest'ultima citochina.

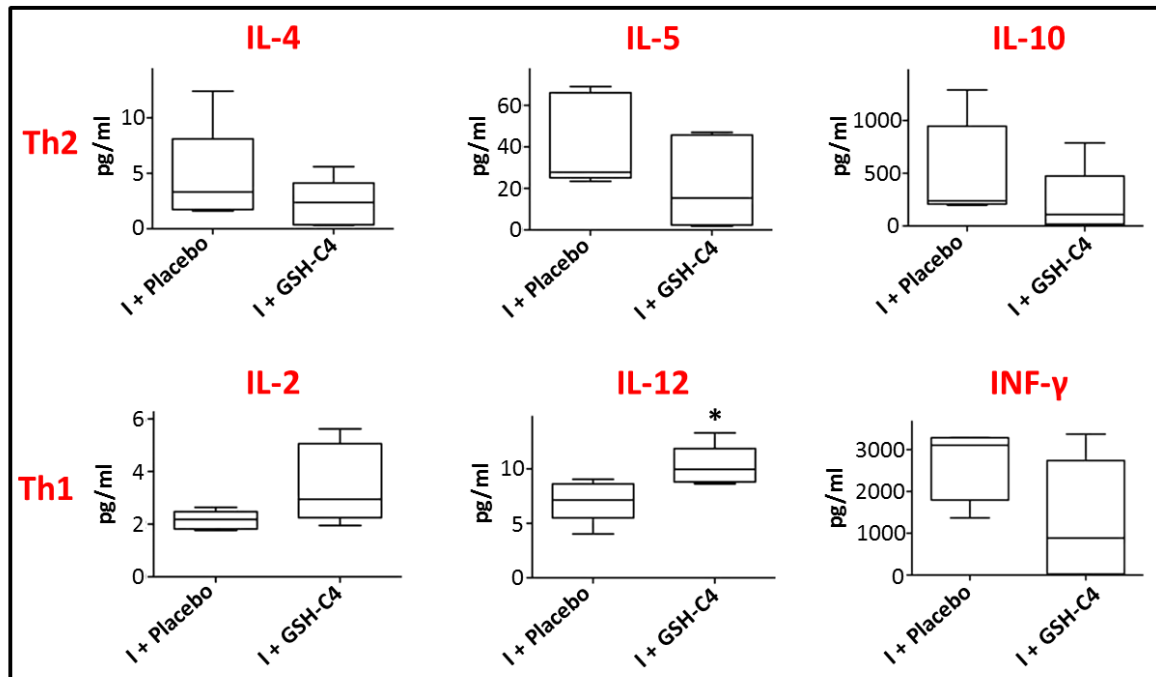


Figura 28. Il lavaggio broncoalveolare è stato recuperato da topi infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati o con il placebo o con il GSH-C4 ($n=5$ /gruppo) dopo 8 giorni dall'inoculo del virus ed i livelli di citochine Th2 (IL-4, IL-5 ed IL-10) e Th1 (IL-2, IL-12 ed INF- γ) sono stati analizzati come descritto nella sezione "Materiali e Metod". * $p < 0.05$.

IgG1 e IgG2a nel plasma di topi infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati con il GSH-C4

I livelli di IgG1 ed IgG2a in topi infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati con il GSH-C4 sono riportati in figura 29. Possiamo notare come sia le IgG1 che le IgG2a siano più elevate di circa una volta e mezza nei topi trattati con il GSH-C4 rispetto ai topi trattati con il placebo, tale differenza risulta significativa nel caso delle IgG2a (Figura 29a).

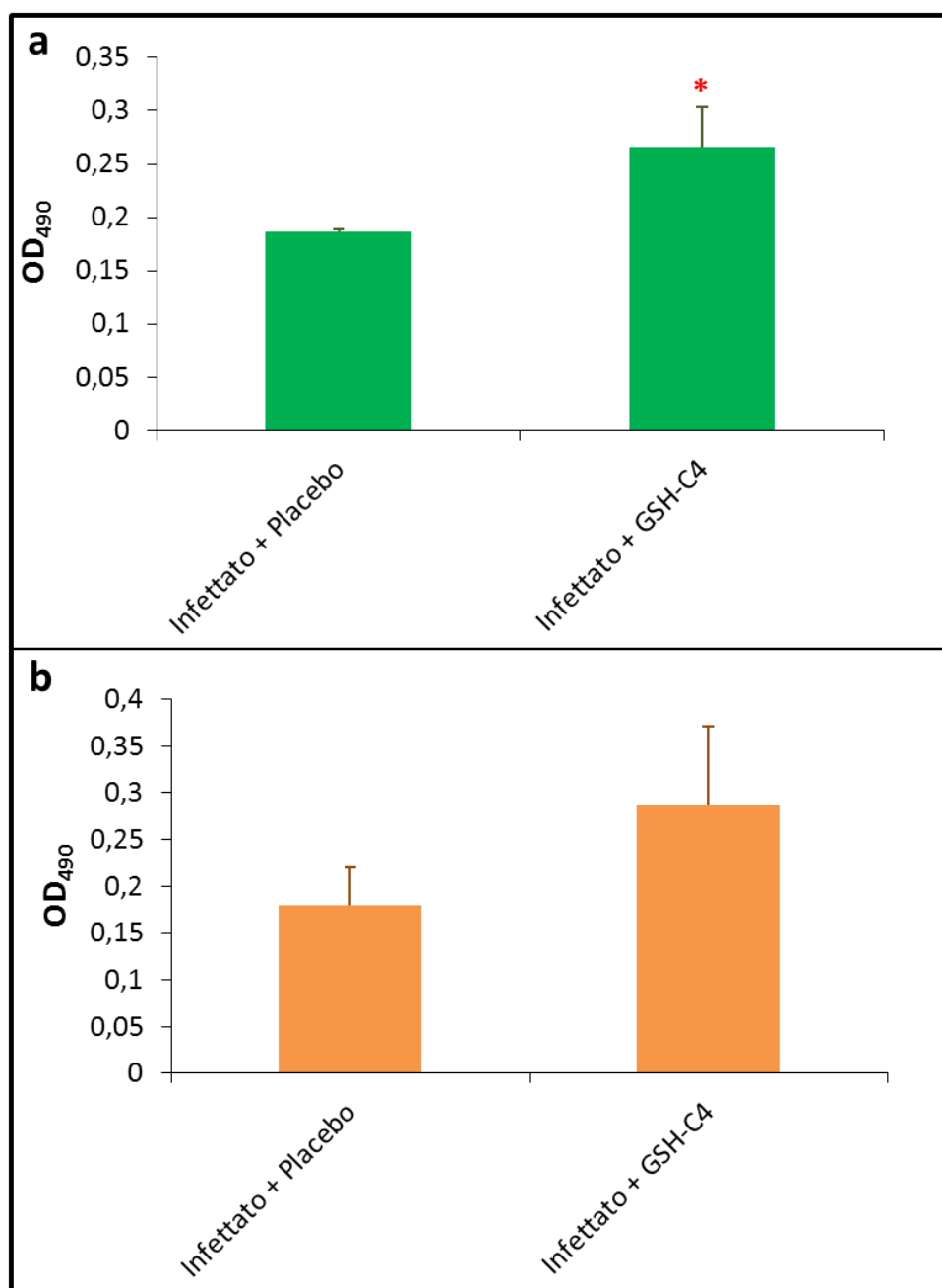


Figura 29. Livelli di IgG2a (a) ed IgG1 (b) nel plasma di topi infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1 e trattati con il GSH-C4. Le analisi sono state effettuate dopo 8 giorni dall'inoculo del virus come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". Ciascun risultato rappresenta la media di 5 valori \pm DS. * $p < 0.05$.

5. DISCUSSIONE

Una deplezione o uno squilibrio dello stato redox è stato osservato in diverse condizioni patologiche come le malattie neurodegenerative, la fibrosi cistica, le infezioni virali, l'AIDS, il cancro nonché nell'invecchiamento [6, 13, 36, 40, 41, 46, 50, 51, 56]. Inoltre, il contenuto di GSH svolge un ruolo importante nella regolazione della risposta immunitaria [73-76]. In condizioni di stress ossidativo moderato, l'ossidazione dei residui di Cys può portare alla formazione di disolfuri misti tra i gruppi tiolici delle proteine e le molecole tioliche a basso peso molecolare, come il GSH (S-glutathionilazione). Le proteine S-glutathionilate possono essere facilmente ridotte quando il normale stato redox intracellulare viene ripristinato mediante agenti riducenti [144]. Per di più, per ripristinare i livelli di GSH, le cellule possono utilizzare la Cys causando una diminuzione di questo aminoacido. Quindi, sia il GSH che la Cys possono essere considerati importanti biomarcatori per valutare il danno ossidativo e la corretta ricostituzione dello stato redox. Lo sviluppo e la validazione di metodi analitici semplici per quantificare il GSH e le altre specie tioliche in campioni biologici è un prerequisito fondamentale per ottenere una valutazione accurata del livello di danno ossidativo, nonché potrebbe essere utile per studiare la progressione della malattia e di conseguenza l'effettiva efficacia di terapie antiossidanti. Il nostro primo obiettivo è stato quindi quello di validare un semplice e rapido metodo HPLC che ci permettesse di quantificare simultaneamente le principali specie tioliche, come il GSH e la Cys, in organi di topo. Tale lavoro preliminare è stato necessario per poter avere a disposizione un metodo semplice, poco costoso, affidabile e veloce al fine di analizzare un gran numero di organi che richiedeva il nostro studio.

La validazione effettuata seguendo gli standard di validazione internazionali [123, 124] ha dimostrato che il metodo è coerente e riproducibile, e che il protocollo di preparazione dei campioni permette di avere un'elevata stabilità degli analiti, prevenendo la conversione delle diverse specie tioliche. Questo è stato sicuramente lo step più delicato, è noto infatti che il GSH va incontro facilmente ad ossidazione.

Altri vantaggi del metodo sono l'utilizzo del DTNB come agente derivatizzante dal momento che la procedura di derivatizzazione richiede tempi brevi (6 minuti) e l'impiego di una HPCL a fase inversa con un rilevatore UV-visibile, che non richiedono una manutenzione particolarmente costosa, e sono sicuramente accessibili alla maggior parte dei laboratori di analisi. Inoltre, è applicabile su tutti gli organi (risultati non mostrati) e su plasma e sangue (dati non mostrati), così come permette di analizzare molecole contenenti gruppi -SH e di distinguerle chiaramente dal GSH e dalla Cys.

I risultati ottenuti mostrano quindi che il metodo proposto risulta essere particolarmente adatto per le misurazioni routinarie dei tioli, in diverse matrici biologiche e può essere utilizzato in studi preclinici finalizzati allo studio di patologie caratterizzate da uno squilibrio dello stato redox, sia per studiare l'andamento della patologia che lo sviluppo di nuove terapie.

Il metodo validato è stato utilizzato anche per valutare il comportamento delle due molecole pro-GSH impiegate nei nostri studi, quali I-152 e GSH-C4, in cellule RAW 264.7 in cui è stata indotta una deplezione di GSH tramite DEM. Questi esperimenti erano volti a capire se le molecole fossero in grado di ripristinare il corretto stato redox in un sistema in cui vi è una sua alterazione. I risultati ottenuti rivelano come, sebbene entrambe le molecole siano in grado di aumentare il contenuto tiolico intracellulare, esse hanno comportamenti estremamente diversi.

Le cellule trattate con basse concentrazioni di I-152 (0.1, 0.5 e 1 mM) mostrano come la molecola sia in grado di ripristinare i normali livelli sia del GSH che della Cys. Al contrario, le alte concentrazioni di I-152 (5, 10 e 20 mM), riducono ulteriormente i livelli del GSH, presumibilmente coniugandosi ad esso tramite l'azione dell'enzima GST. Va sottolineato, che negli stessi campioni sono presenti comunque alte concentrazioni sia di NAC che di I-152 che potrebbero essere utilizzate per la sintesi del GSH come dimostrato dall'analisi di cellule RAW 264.7 trattate con I-152 20 mM e recuperate dopo due ore dalla rimozione della molecola, in cui i livelli del tripeptide così come della Cys sono più elevati di cellule di controllo (dati non mostrati). Questi risultati suggeriscono che l'I-152, a basse concentrazioni si comporta da antiossidante, mentre a concentrazioni più elevate può avere un comportamento pro-ossidante, confermando i dati già presenti in letteratura, riguardanti il comportamento della NAC [106-108]. Questo implica anche l'importanza di conoscere i livelli di GSH intracellulari prima del trattamento e di individuare la concentrazione della molecola anti-ossidante impiegata per aumentare le specie tioliche.

Il comportamento del GSH-C4 è totalmente diverso. Ciascuna concentrazione testata (a partire da 1 mM), è in grado di riportare il GSH a valori di controllo in campioni pre-trattati con il DEM. A concentrazioni maggiori (5, 10 e 20 mM), le cellule possiedono livelli più alti di Cys e di GSH-C4 in maniera dose dipendente. Per spiegare tale situazione abbiamo ipotizzato che siccome il glutatione è substrato per l'ectoenzima transpeptidasi λ -glutamyl (λ GT), questo enzima potrebbe catalizzare il trasferimento della frazione λ -glutamyl dal GSH-C4 su una molecola accettore, ottenendo così il coniugato Cys-Glicina [8]. Il dipeptide Cys-Glicina può essere idrolizzato dalle ectopeptidasi [145] a Cys e glicina, che sarebbero utilizzate in un secondo momento per la sintesi cellulare del GSH. Inoltre, questo meccanismo spiegherebbe le alte concentrazioni di Cys intracellulari trovate in cellule trattate con il GSH-C4 5, 10 e 20 mM. Questa ipotesi, che in ogni caso andrà dimostrata sperimentalmente, è avvalorata dalla mancanza di effetti da parte del GSH-C4 nel ripristinare il GSH intracellulare qualora la deplezione sia indotta dal BSO, una molecola che inibisce la sintesi del tripeptide, bloccando l'enzima γ -glutamyl cisteina sintetasi (dati non mostrati).

Il GSH-C4 ha dimostrato essere efficace contro diversi virus, tanto più efficace non solo rispetto al GSH ma anche rispetto alla NAC, precursore della Cys, ed i dati riportati in questa tesi suggeriscono che potrebbe agire con due meccanismi: da un lato aumenterebbe i livelli di GSH fornendo Cys, dall'altro potrebbe agire come GSH-C4 stesso.

L'insieme di questi risultati dimostrano come sia il GSH-C4 che l'I-152 siano in grado di ripristinare i corretti livelli di GSH, suggerendo che entrambe le molecole potrebbero essere utilizzate in quelle condizioni patologiche caratterizzate da uno squilibrio dello stato redox tradotto in un deficit del tripeptide. Quello che è interessante notare sono le diverse modalità con cui queste molecole producono quest'effetto, che si riflettono nei differenti meccanismi con cui esse influenzano i pathways intracellulari coinvolti nella produzione delle citochine macrofagiche quali IL-12 e IL-27 [118]. Questi studi sono stati effettuati in cellule con normali livelli di GSH, sarà quindi interessante valutare l'azione delle stesse molecole sulla produzione di citochine Th1, in sistemi cellulari in cui è stata indotta una deplezione di GSH. Infatti, i risultati potrebbero essere diversi come suggeriscono i dati ottenuti *in vivo* in topi immunizzati con Ova o Tat aventi alterazioni dello stato redox, nei quali, differentemente da quello riscontrato *in vitro*, entrambe le molecole stimolano la produzione della stessa citochina, l'IL-12 [113-114].

Alla luce dei risultati analizzati finora e sulla base dei dati in letteratura che riportano come in molteplici infezioni virali vi è una deplezione del GSH accompagnata da un'alterata risposta immunitaria Th1/Th2, si è pensato di utilizzare il GSH-C4 e l'I-152 in modelli virali per studiarne l'effettiva capacità *in vivo* di ripristinare una bilanciata risposta antivirale Th1/Th2.

Il primo modello virale scelto è costituito da topi C57BL/6 infettati con il complesso retrovirale LP-BM5.

I risultati ottenuti dimostrano un ruolo centrale della risposta Th2 in entrambe le infezioni studiate (Figura 16 e 24). L'infezione caratterizzata da una dominante risposta umorale è anche associata ad alti livelli di IgE plasmatiche (Figura 15), la cui secrezione è l'effetto più caratteristico dell'IL-4 sulle cellule B *in vivo* [146], anche se va sottolineato che la produzione di questa classe di immunoglobuline potrebbe essere regolata da altri fattori in questo particolare tipo di infezione [147-148].

L'attivazione preferenziale delle cellule di tipo Th2 è stata precedentemente spiegata dall'importante ruolo che hanno le cellule B sull'attivazione delle cellule T in questa infezione, dove la presentazione dell'antigene da parte delle cellule B favorisce il clone di tipo Th2 [142, 149, 150, 151]. Grazie ai risultati ottenuti da questo studio, si può ipotizzare che anche la deplezione di GSH nelle cellule presentanti l'antigene, quali cellule dendritiche e macrofagi, possa favorire la risposta Th2 in seguito ad alterato processamento dell'antigene ed alterata produzione delle citochine Th2.

Non vi sono dubbi sul fatto che esistono molteplici fattori che possono influenzare la risposta immunitaria sia Th1 che Th2 [152], ma la conclusione generale che noi possiamo trarre a seguito di questa sperimentazione è che un fattore importante che potrebbe influire sulla progressione della malattia e la prevalente produzione di citochine Th2 è lo squilibrio dello stato redox. Infatti in tutti gli organi studiati si è riscontrata una deplezione significativa dei livelli del GSH e/o della Cys a tutti e tre i tempi studiati. Questo risultato è particolarmente evidente nella milza e nei linfonodi in quanto sono gli organi linfoidi che contengono il più alto contenuto di DNA BM5d e che sono sottoposti a cambiamenti

fenotipici e proliferativi più significativi [153]. In questi organi è evidente una diminuzione del GSH a 5 e a 9 settimane dall'infezione e già alla seconda settimana, quando una prevalenza della risposta immunitaria Th2 è già riscontrata, si osserva un calo della Cys in entrambi gli organi, statisticamente significativo nella milza. Questa deplezione potrebbe essere giustificata con l'utilizzo della Cys per la neo-sintesi del GSH, che sembrerebbe sufficiente per ripristinare i livelli base di GSH nei primi tempi dell'infezione (2 settimane) ma che risulterebbe insufficiente a tempi successivi, quando i livelli del virus sono presumibilmente maggiori. Inoltre, dopo due settimane dall'inoculo del virus il numero di cellule infettate negli organi è basso, quindi la rilevazione del calo di GSH, parzialmente ripristinato, potrebbe risultare più difficile. La correlazione tra calo di GSH e ridotta produzione di citochine Th1 nelle fasi precoci dell'infezione è stata dimostrata in esperimenti *in vitro*, in cui macrofagi peritoneali infettati con LP-BM5 esprimevano livelli di mRNA dell'IL-12p40 più bassi rispetto ai macrofagi non infettati e una deplezione significativa sia del GSH che della Cys. Questi risultati sono in accordo con i dati presenti in letteratura [80] e confermano il ruolo che il GSH può avere sullo sviluppo di una risposta immunitaria, e che anche nel MAIDS la secrezione delle citochine Th1 può essere influenzate da uno squilibrio dello stato redox.

La deplezione del GSH potrebbe avere un ruolo importante anche in altri aspetti della patologia. Ad esempio, nel pancreas, la Cys risulta essere significativamente più bassa a 5 settimane dall'infezione. Non essendo un organo linfoide si presume che il virus nel pancreas sia presente a concentrazioni molto più basse o sia addirittura assente. Si può quindi ipotizzare che la deplezione del GSH sia meno importante e che la Cys sia sufficiente per ripristinare il normale contenuto del tripeptide. Comunque, il GSH potrebbe avere un ruolo nello sviluppo della pancreatite esocrina descritta in topi aventi il MAIDS [154]. Inoltre, sia le citochine Th1 che quelle Th2 sembrano avere un ruolo nell'indurre lesioni pancreatiche nei topi con questa malattia, sebbene sia prevalente la presenza di cellule Th2 [155].

Nel cervello bassi livelli di GSH sono stati misurati dopo 5 settimane dall'infezione. Questo risultato ha delle implicazioni di notevole importanza considerando il fatto che i topi infettati con LP-BM5 hanno disfunzioni neurologiche simili a quelle osservate nell'uomo a causa dell'AIDS, che compromettono le capacità cognitive e motorie. È noto che nel MAIDS i deficit di apprendimento e di memoria spaziale si sviluppano già dopo 8-10 settimane dall'infezione, mentre il virus può essere rilevato in quest'organo solo dopo 12-15 settimane dall'infezione [156]. Pertanto è difficile stabilire se la presenza del virus è responsabile delle alterazioni neuronali osservate, tuttavia sia il virus che le cellule linfoide periferiche possono contribuire all'encefalopatia che si sviluppa in questi topi [156]. Già studi precedenti avevano messo in evidenza come i livelli alterati di peptidi e proteine neuronali, così come le neurotossine e le citochine prodotte dalla microglia attivata o provenienti da altre fonti, potessero contribuire al disordine neurologico osservato in questi animali [157]. In questa tesi riporto che anche nel cervello è possibile misurare una deplezione del GSH. Naturalmente non possiamo stabilirne la causa, ma si può suggerire

che tale diminuzione potrebbe contribuire alle alterazioni neuronali descritte nel MAIDS, come già osservato in altre malattie neurodegenerative.

I risultati illustrati mostrano come il contenuto tiolico possa avere un ruolo nello sviluppo della patologia così come nell'influenzare la risposta immunitaria nell'infezione da LP-BM5. Di conseguenza, il ripristino di un corretto stato redox intracellulare potrebbe rappresentare un approccio utile per combattere quest'infezione.

A tal fine, sia il GSH-C4 che l'I-152 potrebbero essere utilizzate dal momento che entrambe le molecole possono aumentare il contenuto tiolico negli organi sopra citati sebbene con modalità diverse.

Analizzando l'aumento del GSH nel pancreas e nel cervello in seguito al trattamento con GSH-C4, possiamo fare le seguenti osservazioni. A 30 minuti nel pancreas è stata misurata anche una significativa diminuzione dei livelli di Cys. Questo ci porta ad ipotizzare che la molecola possa stimolare la GCL, che catalizza il primo passo della sintesi del tripeptide, la formazione di λ -glutamilmilcisteina dal glutammato e Cys. Tale enzima è il più critico nel controllo della sintesi del GSH [2] e la sua "up-regulation" nel pancreas può contribuire in modo decisivo al ripristino di GSH durante la pancreatite acuta caratterizzata da una grave deplezione di esso [158]. Studi futuri saranno importanti per chiarire questo risultato e per stabilire se il regolamento di GCL è trascrizionale o post-trascrizionale. Va comunque sottolineato che il GSH-C4, come già precedentemente dimostrato, può prolungare l'azione di NF-kB [118], e questo effetto potrebbe essere particolarmente interessante in quanto un ruolo importante è stato descritto per i fattori di trascrizione sensibili allo stato redox, come NF-kB, nella up-regolazione di GCL [159]. Quindi, il GSH-C4 potrebbe rappresentare un approccio interessante per migliorare l'espressione della GCL e il conseguente aumento del GSH.

Nel cervello, l'aumento di GSH non è affiancato da una diminuzione del livello di Cys, ipotizziamo quindi che il meccanismo del GSH-C4 possa essere diverso e coinvolgere l'attività dell'ectoenzima transpeptidasi λ -glutamyl prima e delle ectopeptidasi dopo come descritto precedentemente. Naturalmente, anche questo aspetto sarà fonte di ulteriori studi per verificarne la veridicità.

L'I-152 è un precursore della NAC e della cisteammina, entrambe presenti in tutti gli organi analizzati, con una minore concentrazione della seconda. Tale risultato potrebbe sembrare strano dal momento che le due specie tioliche dovrebbero essere presenti in quantità equimolari. Tuttavia la cisteammina può reagire con la cistina (dimero della Cys) intracellulare producendo un disulfide misto cisteina-cisteammina e Cys, la quale infatti è sempre presente in quantità superiori al controllo [160]. Naturalmente l'aumento della Cys è in parte dovuto anche alla presenza di NAC. Gli alti livelli di Cys non sono serviti ad aumentare il contenuto di GSH intracellulare come dimostrato dai normali livelli del tripeptide in tutti gli organi testati, ad eccezione dei linfonodi dove si riscontra un significativo calo del GSH rispetto ai controlli. Presumibilmente tale aumento non si verifica in quanto i livelli di GSH negli organi erano normali, mentre ipotizziamo che in tutte quelle condizioni caratterizzate da una deplezione del tripeptide, la Cys potrebbe essere utilizzata

per ricostituire il GSH. Il fatto che i livelli di GSH possano diminuire subito dopo il trattamento con l'I-152, come osservato nei linfonodi, conferma i dati precedentemente ottenuti *in vitro*. Una spiegazione potrebbe essere il fatto che il GSH possa formare disolfuri misti con l'eccesso di tioli forniti dalla molecola, ma l'esatto meccanismo non è stato ancora studiato. Bisogna sottolineare, comunque, che le diverse specie tioliche messe a disposizione della cellula possono avere effetti diversi in base alla loro concentrazione e al preesistente stato redox intracellulare come già osservato in precedenza [105].

Un ulteriore dato interessante riguarda la presenza di queste molecole nel cervello. La presenza a tempi successivi rispetto agli altri organi è probabilmente dovuto alla permeabilità di quest'organo, limitata a causa della presenza della barriera ematoencefalica. È stato descritto un passaggio del GSH dal sangue al cervello, ma non è ancora del tutto chiaro se il tripeptide viene direttamente trasportato o viene suddiviso prima nei singoli aminoacidi nei capillari cerebrali e ri-sintetizzato poi all'interno delle cellule [161]. Inoltre, anche se è stata riportata la presenza di un trasportatore sodio-dipendente del GSH, il suo ruolo esatto nell'omeostasi del cervello rimane ancora da chiarire [161].

Avendo dimostrato che il GSH-C4 può attraversare la barriera emato-encefalica e che l'I-152 può aumentare il contenuto tiolico nel cervello, possiamo suggerire che entrambe le molecole potrebbero rappresentare nuove terapie interessanti per il trattamento di malattie neurodegenerative caratterizzate da una carenza del tripeptide. Inoltre i risultati qui riportati indicano che sia il GSH che l'I-152 possono essere utilizzate per aumentare il GSH o fornire le specie tioliche utili per la sintesi del GSH in tutti gli organi esaminati.

A questo punto abbiamo deciso di valutare l'effetto immunomodulatorio delle due molecole in questa infezione. È già stato dimostrato che l'I-152 è in grado di inibire la replicazione virale in questo modello [117] se somministrata cinque volte a settimana. In questo studio, volendo studiare l'effetto immunomodulatorio, abbiamo deciso di somministrare le molecole 3 volte a settimana. I risultati mostrano che sia il GSH-C4 che l'I-152 influenzano la produzione di citochine Th1/Th2. Possiamo osservare che anche in questo caso gli effetti delle due molecole sono diversi. Il trattamento con I-152 causa un aumento di INF- γ (Th1) nelle fasi precoci dell'infezione (2 settimane), e successivamente (5 settimane) riduce la risposta immunitaria di tipo Th2, diminuendo i livelli dell'IL-4 e dell'IL-5. Questo effetto si ripercuote sulla splenomegalia e linfadenopatia che risultano significativamente ridotte.

Il trattamento con il GSH-C4 sembra avere effetti sulla risposta immunitaria tardivamente rispetto all'I-152. Infatti tale molecola inibisce la produzione dell'IL-4 (Th2) dopo 5 settimane dal trattamento, ma soprattutto stimola la produzione di IL-12, INF- γ e TNF- α dopo 9 settimane. Quest'effetto sulla produzione delle citochine non influenza splenomegalia e linfadenopatia. Supponiamo che un aumento della frequenza del trattamento possa aumentare ed anticipare la capacità del GSH-C4 di modulare la risposta immunitaria verso il tipico profilo citochinico Th1 portando presumibilmente ad una inibizione dei segni della malattia. Sarà interessante studiare i meccanismi biomolecolari

che stanno alla base dei differenti effetti esercitati dalle molecole sulla produzione delle citochine Th1/Th2.

Contemporaneamente si è studiato l'effetto immunomodulatorio del GSH-C4 su un altro modello virale rappresentato da topi anziani infettati con il virus dell'influenza A/PR8/H1N1. È noto che con l'avanzare dell'età diminuisce la capacità di combattere gli organismi patogeni e di controllare le reazioni immuni indesiderate, portando ad un aumento dell'incidenza di alcune malattie infettive ed autoimmuni. Le cause di tutto ciò sono in parte da ricercare nei cambiamenti che subisce il sistema immunitario, noti come immunosenescenza. Tra le alterazioni osservate nell'immunosenescenza vi è uno spostamento della risposta immunitaria verso il tipo Th2, come dimostrato dalla ridotta produzione di IL-2 e dall'aumento dell'IL-4 [126]. Sembra quindi che la dominanza della risposta Th2 così come la diminuita induzione di quella Th1 sia una causa della ridotta protezione contro molti patogeni osservata negli anziani.

Nel nostro studio abbiamo dimostrato come il contenuto del GSH in organi di topi anziani, così come quello della Cys sia più basso rispetto ai topi giovani. Ipotizziamo quindi che sebbene diversi fattori possano contribuire al disequilibrio della risposta immunitaria osservato nella popolazione anziana, il progressivo e graduale abbassamento del contenuto di GSH possa avere un ruolo determinante. Di conseguenza, ripristinare i corretti livelli di GSH potrebbe stimolare la produzione delle citochine Th1 e di conseguenza modulare la risposta immunitaria Th1/Th2.

Tra le malattie infettive, l'influenza negli anziani rappresenta un importante problema di salute pubblica nei paesi industrializzati. La vaccinazione contro l'influenza è efficace solo nel 33% degli individui anziani nel prevenire i segni clinici dell'infezione e nel 74% nel prevenire la mortalità. Non soltanto la risposta al vaccino anti-influenzale è inferiore nella popolazione anziana, ma anche il livello di protezione dall'infezione è più basso rispetto agli adulti più giovani. In questo studio dimostriamo come il GSH-C4 sia in grado di inibire in maniera significativa la replicazione virale in topi anziani e di influenzare la produzione delle citochine Th1/Th2, favorendo la secrezione dell'IL-2 e dell'IL-12. Inoltre, il trattamento stimola la produzione delle immunoglobuline IgG2a, favorita dalle citochine Th1. Questi risultati suggeriscono che ripristinando un corretto stato redox nell'individuo anziano, questo potrebbe combattere più efficacemente l'infezione influenzale, grazie ad una più adeguata risposta cellulare mediata correlata a livelli più alti di citochine Th1.

I risultati riportati in questa tesi dimostrano che GSH-C4 e I-152, entrambe già utilizzate come antivirali, hanno anche un effetto immunomodulatorio *in vivo*. In realtà gli effetti antivirali esercitati da queste due molecole possono essere il risultato di un effetto diretto sul virus (impedendo, ad esempio la produzione di particelle virali mature) e di un effetto immunomodulatorio che permette all'individuo ospite di reagire più efficacemente all'infezione. La combinazione di questi due differenti meccanismi d'azione è il principale vantaggio associato all'utilizzo di queste molecole. Inoltre, il GSH-C4 potrebbe essere utilizzato nei protocolli vaccinali contro l'influenza, per aumentarne l'efficacia rafforzando la risposta cellulare mediata.

6. BIBLIOGRAFIA

- [1] Hell R and Bergmann L. γ -Glutamylcysteine synthetase in higher plants: catalytic properties and subcellular localization. *Planta* 1990; 180:603-612.
- [2] Lu SC. Regulation of glutathione synthesis. *Mol Aspects Med* 2009; 30:42-59.
- [3] Meister A. Glutathione metabolism. *Methods Enzymol* 1995; 251:3-7.
- [4] Orłowski M and Meister A. The gamma-glutamyl cycle: a possible transport system for amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1970; 67:1248-1255.
- [5] Filomeni G, Rotilio G and Ciriolo MR. Disulfide relays and phosphorylative cascades: partners in redox-mediated signaling pathways. *Cell Death Differ* 2005; 12:1555-1563.
- [6] Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K and Hammond CL. Glutathione Dysregulation and the Etiology and Progression of Human Diseases. *Biol Chem* 2009; 390:191-214.
- [7] Cacciatore I, Cornacchia C, Pinnen F, Mollica A and Di Stefano A. Prodrug Approach for Increasing Cellular Glutathione Levels. *Molecules* 2010; 15:1242-1264.
- [8] Dringen R, Gutterer JM and Hirrlinger J. Glutathione metabolism in brain metabolic interaction between astrocytes and neurons in the defense against reactive oxygen species. *Eur J Biochem* 2000; 267:4912-4916.
- [9] Pearce RK, Owen A, Daniel S, Jenner P and Marsden CD. Alterations in the distribution of glutathione in the substantia nigra in Parkinson's disease. *J Neural Transm* 1997; 104:661-677.
- [10] Garrido M, Tereshchenko Y, Zhevtsova Z, Taschenberger G, Bähr M and Kügler S. Glutathione depletion and overproduction both initiate degeneration of nigral dopaminergic neurons. *Acta Neuropathol* 2011; 121:475-85.
- [11] Fahn S and Sulzer D. Neurodegeneration and neuroprotection in Parkinson disease. *NeuroRx* 2004; 1:139-154.
- [12] Ghosh D, LeVault KR and Brewer GJ. Dual-energy precursor and nuclear erythroid-related factor 2 activator treatment additively improve redox glutathione levels and neuron survival in aging and Alzheimer mouse neurons upstream of reactive oxygen species. *Neurobiol Aging* 2014; 35:179-190.
- [13] Roum JH, Buhl R, McElvaney NG, Borok Z and Crystal RG. Systemic deficiency of glutathione in cystic fibrosis. *J Appl Physiol* 1993; 75:2419-2424.
- [14] Linsdell P and Hanrahan JW. Glutathione permeability of CFTR. *Am J Physiol* 1998; 275:C323-C326.
- [15] Hudson VM. Rethinking cystic fibrosis pathology: the critical role of abnormal reduced glutathione (GSH) transport caused by CFTR mutation. *Free Radical Biol Med* 2001; 30:1440-1461.

- [16] Brown RK, Wyatt H, Price JF and Kelly FJ. Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. *Eur Respir J* 1996; 9:334-339.
- [17] Schoenberg MH, Birk D and Beger HG. Oxidative stress in acute and chronic pancreatitis. *Am J Clin Nutr* 1995; 62:1306S-1314S.
- [18] Neuschwander-Tetri BA, Ferrell LD, Sukhabote RJ and Grendell JH. Glutathione monoethyl ester ameliorates caerulein-induced pancreatitis in the mouse. *J Clin Invest* 1992; 89:109-116.
- [19] Alsfasser G, Gock M, Herzog L, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E and Schmidt J. Glutathione depletion with L-buthionine-(S,R)-sulfoximine demonstrates deleterious effects in acute pancreatitis of the rat. *Dig Dis Sci* 2002; 47:1793-1799.
- [20] Leopold JA and Loscalzo J. Oxidative enzymopathies and vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1332-1340.
- [21] Widder JD, Guzik TJ, Mueller CF, Clempus RE, Schmidt HH, Dikalov SI, Griendling KK, Jones DP and Harrison DG. Role of the multidrug resistance protein-1 in hypertension and vascular dysfunction caused by angiotensin II. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27:762-768.
- [22] Rosenblat M, Volkova N, Coleman R and Aviram M. Anti-oxidant and anti-atherogenic properties of liposomal glutathione: studies in vitro, and in the atherosclerotic apolipoprotein E-deficient mice. *Atherosclerosis* 2007; 195:e61-e68.
- [23] Traverso N, Ricciarelli R, Nitti M, Marengo B, Furfaro AL, Pronzato MA, Marinari UM and Domenicotti C. Role of Glutathione in Cancer Progression and Chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* 2013; 2013:972913.
- [24] Balendiran GK, Dabur R and Fraser D. The role of glutathione in cancer. *Cell Biochem Funct* 2004; 22:343-352.
- [25] Estrela JM, Ortega A and Obrador E. Glutathione in cancer biology and therapy. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2006; 43:143-181.
- [26] Messina JP and Lawrence DA. Cell cycle progression of glutathione-depleted human peripheral blood mononuclear cells is inhibited at S phase. *J Immunol* 1989; 143:1974-1981.
- [27] Lu SC and Ge JL. Loss of suppression of GSH synthesis at low cell density in primary cultures of rat hepatocytes. *Am J Physiol* 1992; 263:C1181-C1189.
- [28] Carretero J, Obrador E, Anasagasti MJ, Martin JJ, Vidal-Vanaclocha F and Estrela JM. Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. *Clin Exp Metastasis* 1999; 17:567-574.
- [29] Huang ZZ, Chen C, Zeng Z, Yang H, Oh J, Chen L and Lu SC. Mechanism and significance of increased glutathione level in human hepatocellular carcinoma and liver regeneration. *FASEB J* 2001; 15:19-21.
- [30] Yao KS, Godwin AK, Johnson SW, Ozols RF, O'Dwyer PJ and Hamilton TC. Evidence for altered regulation of gamma-glutamylcysteine synthetase gene expression among cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human ovarian cancer cell lines. *Cancer Res* 1995; 55:4367-4374.

- [31] Ortega A, Carretero J, Obrador E and Estrela JM. Tumoricidal activity of endothelium-derived NO and the survival of metastatic cells with high GSH and bcl-2 levels. *Nitric Oxide* 2008; 19:107-114.
- [32] Obrador E, Carretero J, Ortega A, Medina I, Rodilla V, Pellicer JA and Estrela JM. Gamma-glutamyl transpeptidase overexpression increases metastatic growth of B16 melanoma cells in the mouse liver. *Hepatology* 2002; 35:74-81.
- [33] Ortega A, Mena S and Estrela JM. Oxidative and nitrosative stress in the metastatic microenvironment. *Cancers* 2010; 2:274-304.
- [34] Franco R, Sanchez-Olea R, Reyes-Reyes EM and Panayiotidis MI. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Menage a trois. *Mutat Res* 2009; 674:3-22.
- [35] Calvert P, Yao KS, Hamilton TC and O'Dwyer PJ. Clinical studies of reversal of drug resistance based on glutathione. *Chem Biol Interact* 1998; 111-112:213-224.
- [36] Beck MA, Handy J and Levander OA. The role of oxidative stress in viral infections. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 917:906-912.
- [37] Palamara AT, Perno CF, Ciriolo MR, Dini L, Balestra E, D'Agostini C, Di Francesco P, Favalli C, Rotilio G and Garaci E. Evidence for antiviral activity of glutathione: in vitro inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *Antiviral Res* 1995; 27:237-253.
- [38] Nucci C, Palamara AT, Ciriolo MR, Nencioni L, Savini P, D'Agostini C, Rotilio G, Cerulli L and Garaci E. Imbalance in corneal redox state during herpes simplex virus 1-induced keratitis in rabbits. Effectiveness of exogenous glutathione supply. *Exp Eye Res* 2000; 70:215-220.
- [39] Vogel JU, Cinatl J, Dauletbaev N, Buxbaum S, Treusch G, Cinatl J Jr, Gerein V and Doerr HW. Effects of S-acetylglutathione in cell and animal model of herpes simplex virus type 1 infection. *Med Microbiol. Immunol* 2005; 194:55-59.
- [40] Buhl R, Jaffe HA, Holroyd KJ, Wells FB, Mastrangeli A, Saltini C, Cantin AM and Crystal RG. Systemic glutathione deficiency in symptom-free HIV-seropositive individuals. *Lancet* 1989; 2:1294-1298.
- [41] Herzenberg LA, De Rosa SC, Dubs JG, Roederer M, Anderson MT, Ela SW, Deresinski SC and Herzenberg LA. Glutathione deficiency is associated with impaired survival in HIV disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94:1967-1972.
- [42] Poli G, Bressler P, Kinter A, Duh E, Timmer WC, Rabson A, Justement JS, Stanley S and Fauci AS. Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanism. *J Exp Med* 1990; 172:151-158.
- [43] Staal FJ. Glutathione and HIV infection: reduced reduced, or increased oxidized? *Eur J Clin Invest* 1998; 28:194-196.
- [44] Fraternale A, Paoletti MF, Casabianca A, Nencioni L, Garaci E, Palamara AT and Magnani M. GSH and analogs in antiviral therapy. *Mol Aspects Med* 2009; 30:99-110.

- [45] Ciriolo MR, Palamara AT, Incerpi S, Lafavia E, Buè MC, De Vito P, Garaci E and Rotilio G. Loss of GSH, oxidative stress, and decrease of intracellular pH as sequential steps in viral infection. *J Biol Chem* 1997; 272:2700–2708.
- [46] Garaci E, Palamara AT, Ciriolo MR, D'Agostini C, Abdel-Latif MS, Aquaro S, Lafavia E and Rotilio G. Intracellular GSH content and HIV replication in human macrophages. *J Leukoc Biol* 1997; 62:54-59.
- [47] Westendorp MO, Shatrov VA, Schulze-Osthoff K, Frank R, Kraft M, Los M, Krammer PH, Dröge W and Lehmann V. HIV-1 Tat potentiates TNF induced NF-kappa B activation and cytotoxicity by altering the cellular redox state. *EMBO J* 1995; 14:546-554.
- [48] Price TO, Ercal N, Nakaoke R and Banks WA. HIV-1 viral proteins gp 120 and Tat induce oxidative stress in brain endothelial cells. *Brain Res* 2005; 1045:57-63.
- [49] Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM and Weinman SA. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology* 2002; 122:366-375.
- [50] Barbaro G, Di Lorenzo G, Soldini M, Parrotto S, Bellomo G, Belloni G, Grisorio B and Barbarini G. Hepatic glutathione deficiency in chronic hepatitis C: quantitative evaluation in patients who are HIV positive and HIV negative and correlations with plasmatic and lymphocytic concentrations and with the activity of the liver disease. *Am J Gastroenterol* 1996; 91:2569-2573.
- [51] Mahmood S, Kawanaka M, Kamei A, Izumi A, Nakata K, Niiyama G, Ikeda H, Hanano S, Suehiro M, Togawa K and Yamada G. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress markers in chronic hepatitis C. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6:19-24.
- [52] Korenaga M, Wang T, Li Y, Showalter LA, Chan T, Sun J and Weinman SA. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem* 2005; 280:37481-37488.
- [53] Czeczot H, Scibior D, Skrzycki M and Podsiad M. Glutathione and GSH-dependent enzymes in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *Acta Biochim Pol* 2006; 53:237-242.
- [54] Nencioni L, Iuvara A, Aquilano K, Ciriolo MR, Cozzolino F, Rotilio G, Garaci E and Palamara AT. Influenza A virus replication is dependent on an antioxidant pathway that involves GSH and Bcl-2. *FASEB J* 2003; 17:758-760.
- [55] Cai J, Chen Y, Seth S, Furukawa S, Compans RW and Jones DP. Inhibition of influenza infection by glutathione. *Free Radic Biol Med* 2003; 34:928-936.
- [56] Samiec PS, Drews-Botsch C, Flagg EW, Kurtz JC, Sternberg P Jr, Reed RL and Jones DP. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1998; 24:699-704.
- [57] Knight JA. The biochemistry of aging. *Adv Clin Chem* 2000; 35:1-62.
- [58] Viveros MP, Arranz L, Hernanz A, Miquel J and De la Fuente M. A Model of Premature Aging in Mice Based on Altered Stress-related Behavioral Response and Immunosenescence. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14:157-62.

- [59] Lang CA, Mills BJ, Mastropaolo W and Liu MC. Blood glutathione decreases in chronic diseases. *J Lab Clin Med* 2000; 135:402-405.
- [60] Sethna SS, Holleschau AM and Rathbun WB. Activity of glutathione synthesis enzymes in human lens related to age. *Curr Eye Res* 1982-1983; 2:735-42.
- [61] Katakura K, Kishida K and Hirano H. Changes in rat lens proteins and glutathione reductase activity with advancing age. *Int J Vitam Nutr Res* 2004; 74:329-33.
- [62] Bains JS and Shaw CA. Neurodegenerative disorders in humans: The role of glutathione in oxidative stress-mediated neuronal death. *Brain Res Rev* 1997; 25:335-358.
- [63] Yoshikawa M and Hirai S. Lipid peroxide formation in the brain of aging rats. *J Gerontol* 1967; 22:162-165.
- [64] Sanchez-Rodriguez MA, Ruiz-Ramos M, Correa-Munoz E and Mendoza-Nunez VM. Oxidative Stress as a Risk Factor for Osteoporosis in Elderly Mexicans as Characterized by Antioxidant Enzymes. *BMC Musculoskelet Disord* 2007; 8:124.
- [65] Inglot AD. Classification of cytokines according to the receptor code. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 1997; 45:353-357.
- [66] Yamane H and Paul WE. Early signaling events that underlie fate decisions of naive CD4(+) T cells toward distinct T-helper cell subsets. *Immunol Rev* 2013; 252:12-23.
- [67] Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:133-146.
- [68] Tripp CS, Wolf SF and Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:3725-3729.
- [69] Haas H, Falcone FH, Holland MJ, Schramm G, Haisch K, Gibbs BF, Bufe A and Schlaak M. Early interleukin-4: its role in the switch towards a Th2 response and IgE-mediated allergy. *Int Arch Allergy Immunol* 1999; 119:86-94.
- [70] Manetti R, Parronchi P, Giudizi MG, Piccinini MP, Maggi E, Trinchieri G and Romagnani S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med* 1993; 177:1199-1204.
- [71] Gazzinelli RT, Wysocka M, Hayashi S, Denkers EY, Hieny S, Caspar P, Trinchieri G and Sher A. Parasite-induced IL-12 stimulates early IFN-gamma synthesis and resistance during acute infection with *Toxoplasma gondii*. *J Immunol* 1994; 153:2533-2543.
- [72] Mosmann TR and Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7:145-173.
- [73] Short S, Merkel BJ, Caffrey R and McCoy KL. Defective antigen processing correlates with a low level of intracellular glutathione. *Eur J Immunol* 1996; 26:3015-3020.

- [74] Lemaire G, Guittet O, Vesin MF, Lepoivre M and Cottet MH. Glutathione depletion reveals impairment of antigen processing and inhibition of cathepsin activity by nitric oxide in antigen-presenting cells. *Mol Immunol* 2009; 46:1100-1108.
- [75] Murata Y, Shimamura T and Hamuro J. The polarization of T(h)1/T(h)2 balance is dependent on the intracellular thiol redox status of macrophages due to the distinctive cytokine production. *Int Immunol* 2002; 14:201-212.
- [76] Townsend DM, Tew KD and Tapiero H. The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* 2003; 57:145-155.
- [77] Weiskopf D, Schwanninger A, Weinberger B, Almanzar G, Parson W, Buus S, Lindner H and Grubeck-Loebenstien B. Oxidative stress can alter the antigenicity of immunodominant peptides. *J Leukoc Biol* 2010; 87:165-172.
- [78] Preynat-Seauve O, Coudurier S, Favier A, Marche PN and Villiers C. Oxidative stress impairs intracellular events involved in antigen processing and presentation to T cells. *Cell Stress Chaperones* 2003; 8:162-171.
- [79] Koike Y, Hisada T, Utsugi M, Ishizuka T, Shimizu Y, Ono A, Murata Y, Hamuro J, Mori M and Dobashi K. Glutathione redox regulates airway hyperresponsiveness and airway inflammation in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 37:322-329.
- [80] Murata Y, Amao M, Yoneda J and Hamuro J. Intracellular thiol redox status of macrophages directs the Th1 skewing in thioredoxin transgenic mice during aging. *Mol Immunol* 2002; 38:747-757.
- [81] Dobashi K, Aihara M, Araki T, Shimizu Y, Utsugi M, Iizuka K, Murata Y, Hamuro J, Nakazawa T and Mori M. Regulation of LPS induced IL-12 production by IFN-gamma and IL-4 through intracellular glutathione status in human alveolar macrophages. *Clin Exp Immunol* 2001; 124:290-296.
- [82] Kamide Y, Utsugi M, Dobashi K, Ono A, Ishizuka T, Hisada T, Koga Y, Uno K, Hamuro J and Mori M. Intracellular glutathione redox status in human dendritic cells regulates IL-27 production and T-cell polarization. *Allergy* 2011; 66:1183-1192.
- [83] Liang SM, Liang CM, Hargrove ME and Ting CC. Regulation by glutathione of the effect of lymphokines on differentiation of primary activated lymphocytes. Influence of glutathione on cytotoxic activity of CD3-AK-. *J Immunol* 1991; 146:1909-1913.
- [84] Fraternale A, Paoletti MF, Casabianca A, Oiry J, Clayette P, Vogel JU, Cinatl J Jr, Palamara AT, Sgarbanti R, Garaci E, Millo E, Benatti U and Magnani M. Antiviral and immunomodulatory properties of new pro-glutathione (GSH) molecules. *Curr Med Chem* 2006; 13:1749-1755.
- [85] Giordani L, Quaranta MG, Malorni W, Boccanera M, Giacomini E and Viora M. N-acetylcysteine inhibits the induction of an antigen-specific antibody response down-regulating CD40 and CD27 co-stimulatory molecules. *Clin Exp Immunol* 2002; 129:254-264.
- [86] Manetti R, Annunziato F, Biagiotti R, Giudizi MG, Piccinni MP, Giannarini L, Sampaogno S, Parronchi P, Vinante F, Pizzolo G, Maggi E and Romagnani S. CD30 expression by CD8+ T cells producing type 2 helper cytokines. Evidence for large numbers of CD8+CD30+ T cell clones in human immunodeficiency virus infection. *J Exp Med* 1994; 180:2407-2411.

- [87] Bengtsson A, Holm L, Bäck O, Fransson J and Scheynius A. Elevated serum levels of soluble CD30 in patients with atopic dermatitis (AD). *Clin Exp Immunol* 1997; 109:533-537.
- [88] Mavalia C, Scaletti C, Romagnani P, Carossino AM, Pignone A, Emmi L, Pupilli C, Pizzolo G, Maggi E and Romagnani S. Type 2 helper T-cell predominance and high CD30 expression in systemic sclerosis. *Am J Pathol* 1997; 151:1751-1758.
- [89] Caligaris-Cappio F, Bertero MT, Converso M, Stacchini A, Vinante F, Romagnani S and Pizzolo G. Circulating levels of soluble CD30, a marker of cells producing Th2-type cytokines, are increased in patients with systemic lupus erythematosus and correlate with disease activity. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13:339-343.
- [90] Fernandez-Checa JC, Garcia-Ruiz C, Ookhtens M and Kaplowitz N. Impaired uptake of glutathione by hepatic mitochondria from chronic ethanol-fed rats. Tracer kinetic studies in vitro and in vivo and susceptibility to oxidant stress. *J Clin Invest* 1991; 87:397-405.
- [91] Puri RN and Meister A. Transport of glutathione, as γ -glutamylcysteinylglycyl ester, into liver and kidney. *Proc Natl Acad Sci* 1983; 80:5258-5260.
- [92] Tsan MF, White JE and Rosano CL. Modulation of endothelial GSH concentrations: Effect of exogenous GSH and GSH monoethyl ester. *J Appl Physiol* 1989; 66:1029-1034.
- [93] Zeevalk GD, Manzino L, Sonsalla PK and Bernard LP. Characterization of intracellular elevation of glutathione with glutathione monoethyl ester and GSH in brain and neuronal cultures: Relevance to Parkinson's disease. *Exp Neurol* 2007; 203:512-520.
- [94] Jennische E. Possible influence of glutathione on postischemic liver injury. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1984; 92:55-64.
- [95] Grattagliano I, Vendemiale G and Lauterburg BH. Reperfusion injury of the liver: Role of mitochondria and protection by glutathione ester. *J Surg Res* 1999; 86:2-8.
- [96] Yamaguchi N, Yajima N, Ishida M, Shimada T and Hiraishi H. Protection of cultured gastric cells against tert-butyl hydroperoxide by glutathione isopropyl ester. *Eur J Pharmacol* 1998; 351:363-369.
- [97] Gotoh O, Yamamoto M, Tamura A and Sano K. effect of YM737, a new glutathione analog, on ischemic brain edema. *Acta Neurochir* 1994; 60:318-320.
- [98] Shibata S, Tominaga K and Watanabe S. Glutathione protects against hypoxic/hypoglycaemic decreases in 2-deoxyglucose uptake and presynaptic spikes in hippocampal slices. *Eur J Pharmacol* 1995; 273:191-195.
- [99] Berkeley LI, Cohen JF, Crankshaw DL, Shirota FN and Nagasawa HT. Hepatoprotection by-L-cysteine-glutathione mixed disulfide, a sulfhydryl-modified prodrug of glutathione. *J Biochem Mol Toxicol* 2003; 17:95-97.
- [100] De Rosa SC, Zaretsky MD, Dubs JG, Roederer M, Anderson M, Green A, Mitra D, Watanabe N, Nakamura H, Tjioe I, Deresinski SC, Moore WA, Ela SW, Parks D, Herzenberg LA and Herzenberg LA. N-acetylcysteine replenishes glutathione in HIV infection. *Eur J Clin Invest* 2000; 30:915-929.

- [101] Stanziale SF, Petrowsky H, Adusumilli PS, Ben-Porat L, Gonen M and Fong Y. Infection with oncolytic herpes simplex virus-1 induces apoptosis in neighboring human cancer cells: a potential target to increase anticancer activity. *Clin Cancer Res* 2004; 10:3225-3232.
- [102] Ghezzi P and Ungheri D. Synergistic combination of N-acetylcysteine and ribavirin to protect from lethal influenza viral infection in a mouse model. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2004; 17:99-102.
- [103] Kelly GS. Clinical applications of N-acetylcysteine. *Altern Med Rev* 1998; 3:114-127.
- [104] Ates B, Abraham L and Ercal N. Antioxidant and free radical scavenging properties of Nacetylcysteine amide (NACA) and comparison with N-acetylcysteine (NAC). *Free Radic Res* 2008; 42:372-377.
- [105] Alam K, Ghousunnissa S, Nair S, Valluri VL and Mukhopadhyay S. Glutathione-Redox Balance Regulates c-rel-Driven IL-12 Production in Macrophages: Possible Implications in Antituberculosis Immunotherapy. *J Immunol* 2010; 184:2918-2929.
- [106] Sprong RC, Winkelhuyzen-Janssen AM, Aarsman CJ, Van Oirschot JF, Van der Bruggen T and Van Asbeck BS. Low-dose N-acetylcysteine protects rats against endotoxin-mediated oxidative stress, but high-dose increases mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157:1283-1293.
- [107] Kleinveld HA, Demacker PN and Stalenhoef AF. Failure of Nacetylcysteine to reduce low-density lipoprotein oxidizability in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 43:639-642.
- [108] Wang AL, Wang JP, Wang H, Chen YH, Zhao L, Wang LS, Wei W and Xu DX. A dual effect of N-acetylcysteine on acute ethanol-induced liver damage in mice. *Hepato Res* 2006; 34:199-206.
- [109] Mihm S, Galter D and Dröge W. Modulation of transcription factor NF kappa B activity by intracellular glutathione levels and by variations of the extracellular cysteine supply. *FASEB J* 1995; 9:246-252.
- [110] Song M, Kellum JA, Kaldas H and Fink MP. Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308:307-316.
- [111] Wadsworth TL and Koop DR. Effects of the wine polyphenolics quercetin and resveratrol on pro-inflammatory cytokine expression in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Pharmacol* 1999; 57:941-949.
- [112] Li YQ, Zhang ZX, Xu YJ, Ni W, Chen SX, Yang Z and Ma D. N-Acetyl-L-cysteine and pyrrolidine dithiocarbamate inhibited nuclear factor-kappaB activation in alveolar macrophages by different mechanisms. *Acta Pharmacol Sin* 2006; 27:339-346.
- [113] Fraternale A, Paoletti MF, Dominici S, Caputo A, Castaldello A, Millo E, Brocca-Cofano E, Smietana M, Clayette P, Oiry J, Benatti U and Magnani M. The increase in intra-macrophage thiols induced by new pro-GSH molecules directs the Th1 skewing in ovalbumin immunized mice. *Vaccine* 2010; 28:7676-7682.
- [114] Fraternale A, Paoletti MF, Dominici S, Buondelmonte C, Caputo A, Castaldello A, Tripiciano A, Cafaro A, Palamara AT, Sgarbanti R, Garaci E, Ensoli B and Magnani M. Modulation of Th1/Th2 immune responses to HIV-1 Tat by new pro-GSH molecules. *Vaccine* 2011; 29:6823-6829.

- [115] Oiry J, Mialocq P, Puy JY, Fretier P, Dereuddre-Bosquet N, Dormont D, Imbach JL and Clayette P. Synthesis and biological evaluation in human monocyte-derived macrophages of N-(N-acetyl-L-cysteinyl)-S-acetylcysteamine analogues with potent antioxidant and anti-HIV activities. *J Med Chem* 2004 25; 47:1789-95.
- [116] Palamara AT, Brandi G, Rossi L, Millo E, Benatti U, Nencioni L, Iuvara A, Garaci E and Magnani M. New synthetic glutathione derivatives with increased antiviral activities. *Antivir Chem Chemother* 2004; 15:83-91.
- [117] Fraternale A, Paoletti MF, Casabianca A, Orlandi C, Schiavano GF, Chiarantini L, Clayette P, Oiry J, Vogel JU, Cinatl J and Magnani M. Inhibition of murine AIDS by proglutathione (GSH) molecules. *Antiviral Res* 2008; 77:120-127.
- [118] Fraternale A, Crinelli R, Casabianca A, Paoletti MF, Orlandi C, Carloni E, Smietana M, Palamara AT, Magnani M. Molecules Altering the Intracellular Thiol Content Modulate NF- κ B and STAT-1/IRF-1 Signalling Pathways and IL-12 p40 and IL-27 p28 Production in Murine Macrophages. *Plos One* 9:e57866.
- [119] Watson RR. Murine models for acquired immune deficiency syndrome. *Life Sci* 1989; 44:iii-ixv.
- [120] Palamara AT, Garaci E, Rotilio G, Ciriolo MR, Casabianca A, Fraternale A, Rossi L, Schiavano GF, Chiarantini L and Magnani M. Inhibition of murine AIDS by reduced glutathione. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1996; 12:1373-1381.
- [121] Magnani M, Fraternale A, Casabianca A, Schiavano GF, Chiarantini L, Palamara AT, Ciriolo MR, Rotilio G and Garaci E. Antiretroviral effect of combined zidovudine and reduced glutathione therapy in murine AIDS. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1997; 13:1093-1099.
- [122] Sher A, Gazzinelli RT, Oswald IP, Clerici M, Kullberg M, Pearce EJ, Berzofsky JA, Mosmann TR, James SL and Morse HC 3rd. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. *Immunol Rev* 1992; 127:183-204.
- [123] US-FDA Bioanalytical Method Validation Guidance
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>
- [124] European Medicines Agency Guideline
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
- [125] Pawelec G, Larbi A and Derhovanessian E. Senescence of the human immune system. *J Comp Pathol* 2010; 142 Suppl 1:S39-44.
- [126] Rink L, Cakman I and Kirchner H. Altered cytokine production in the elderly. *Mech Ageing Dev* 1998; 102:199-209.
- [127] Grubeck-Loebenstein B and Wick G. The aging of the immune system. *Adv Immunol* 2002; 80:243-284.
- [128] Rukavina D, Laskarin G, Rubesa G, Strbo N, Bedenicki I, Manestar D, Glavas M, Christmas SE and Podack ER. Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Blood* 1998; 92:2410-2420.

- [129] Tortorella C, Pisconti A, Piazzolla G and Antonaci S. APC-dependent impairment of T cell proliferation in aging: role of CD28- and IL-12/IL-15-mediated signaling. *Mech Ageing Dev* 2002; 123:1389-1402.
- [130] Currier NL and Miller SC. Natural killer cells from aging mice treated with extracts from *Echinacea purpurea* are quantitatively and functionally rejuvenated. *Exp Gerontol* 2000; 35:627-639.
- [131] Amatore D, Sgarbanti R, Aquilano K, Baldelli S, Limongi D, Civitelli L, Nencioni L, Garaci E, Ciriolo MR, Palamara AT. Influenza virus replication in lung epithelial cells depends on redox-sensitive pathways activated by NOX4-derived ROS. *Cell Microbiol* 2015; 17:131-145.
- [132] Sgarbanti R, Nencioni L, Amatore D, Coluccio P, Fraternale A, Sale P, Mammola CL, Carpino G, Gaudio E, Magnani M, Ciriolo MR, Garaci E and Palamara AT. Redox regulation of the influenza hemagglutinin maturation process: a new cell-mediated strategy for anti-influenza therapy. *Antioxid Redox Signal* 2011; 15:593-606.
- [133] Beutler E. Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. New York, USA Press 1984.
- [134] Mosier DE, Yetter RA and Morse HC. Functional T lymphocytes are required for a murine retrovirus-induced immunodeficiency disease (MAIDS). *J Exp Med* 1987; 165:1737-1742.
- [135] Serafini S, Fraternale A, Rossi L, Casabianca A, Antonelli A, Paoletti MF, Orlandi C, Pierige F, Sfara C, Schiavano GF and Magnani M. Effect of macrophage depletion on viral DNA rebound following antiretroviral therapy in a murine model of AIDS (MAIDS). *Antiviral Res* 2009; 81:93-102.
- [136] Rossi L, Brandi G, Schiavano GF, Chiarantini L, Albano A and Magnani M. In vitro and in vivo toxicity of 2',3'-dideoxycytidine in mice. *Chem Biol Interact* 1992; 85:255-263.
- [137] Casabianca A, Orlandi C, Canovari B, Scotti M, Acetoso M, Valentini M, Petrelli E and Magnani M. A real time PCR platform for the simultaneous quantification of total and extrachromosomal HIV DNA forms in blood of HIV-1 infected patients. *PLoS One* 2014; 9:e111919.
- [138] Casabianca A, Orlandi C, Fraternale A, Magnani M. Development of a real-time PCR assay using SYBR Green I for provirus load quantification in a murine model of AIDS. *J Clin Microbiol* 2004; 42:4361-4364.
- [139] Maxeiner JH, Karwot R, Hausding M, Sauer KA, Scholtes P and Finotto S. A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators. *Nat Protoc* 2007; 2:105-12.
- [140] Fraternale A, Casabianca A, Tonelli A, Vallanti G, Chiarantini L, Brandi G, Celeste AG and Magnani M. Inhibition of murine AIDS by alternate administration of azidothymidine and fludarabine monophosphate. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2000; 23:209-220.
- [141] Fraternale A, Casabianca A, Tonelli A, Chiarantini L, Brandi G and Magnani M. New drug combinations for the treatment of murine AIDS and macrophage protection. *Eur J Clin Invest* 2001; 31:248-252.
- [142] Gazzinelli RT, Makino M, Chattopadhyay SK, Snapper CM, Sher A, Hugin AW, Morse HC. CD4+ subset regulation in viral infection. Preferential activation of Th2 cells during progression of retrovirus-induced immunodeficiency in mice. *J Immunol* 1992; 148:182-188.

- [143] Deng Y, Jing Y, Campbell AE and Gravenstein S. Age-related impaired type 1 T cell responses to influenza: reduced activation ex vivo, decreased expansion in CTL culture in vitro, and blunted response to influenza vaccination in vivo in the elderly. *J Immunol* 2004; 172:3437-3446.
- [144] Dalle-Donne I, Rossi R, Colombo R, Giustarini D and Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem* 2006; 52:601-623.
- [145] Tate SS. Microvillus membrane peptidases that catalyze hydrolysis of cysteinylglycine and its derivatives. *Methods Enzymol* 1985; 113:471-484.
- [146] Chatila TA. Interleukin-4 receptor signaling pathways in asthma pathogenesis. *Trends Mol Med* 2004; 10:493-499.
- [147] Morawetz RA, Gabriele L, Rizzo LV, Noben-Trauth N, Kühn R, Rajewsky K, Müller W, Doherty TM, Finkelman F, Coffman RL and Morse HC 3rd. Interleukin (IL)-4-independent immunoglobulin class switch to immunoglobulin (Ig)E in the mouse. *J Exp Med* 1996; 184:1651-1661.
- [148] Morse HC 3rd, McCarty T, Giese NA, Taddesse-Heath L and Grusby MJ. STAT6-deficient mice exhibit normal induction of murine AIDS and expression of immunoglobulin E following infection with LP-BM5 murine leukemia viruses. *J Virol* 1999; 73:7093-7095.
- [149] Huang M, Simard C, Kay DG and Jolicoeur P. The majority of cells infected with the defective murine AIDS virus belong to the B-cell lineage. *J Virol* 1991; 65:6562-6571.
- [150] Cerny A, Hügin AW, Hardy RR, Hayakawa K, Zinkernagel RM, Makino M and Morse HC 3rd. B cells are required for induction of T cell abnormalities in a murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome. *J Exp Med* 1990; 171:315-320.
- [151] Gajewski TF, Pinnas M, Wong T and Fitch FW. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. *J Immunol* 1991; 146:1750-1758.
- [152] Kidd P. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern Med Rev* 2003; 8:223-246.
- [153] Yetter RA, Buller RM, Lee JS, Elkins KL, Mosier DE, Fredrickson TN and Morse HC 3rd. CD4+ T cells are required for development of a murine retrovirus-induced immunodeficiency syndrome (MAIDS). *J Exp Med* 1988; 168:623-635.
- [154] Watanabe S, Suzuki K, Kawauchi Y, Yamagiwa S, Yoneyama H, Kawachi H, Okada Y, Shimizu F, Asakura H and Aoyagi Y. Kinetic analysis of the development of pancreatic lesions in mice infected with a murine retrovirus. *Clin Immunol* 2003; 109:212-223.
- [155] Löhr JM, Faissner R, Koczan D, Bewerunge P, Bassi C, Brors B, Eils R, Frulloni L, Funk A, Halangk W, Jesenofsky R, Kaderali L, Kleeff J, Krüger B, Lerch MM, Lösel R, Magnani M, Neumaier M, Nittka S, Sahin-Tóth M, Sängler J, Serafini S, Schnölzer M, Thierse HJ, Wandschneider S, Zamboni G and Klöppel G. Autoantibodies against the exocrine pancreas in autoimmune pancreatitis: gene and protein expression profiling and immunoassays identify pancreatic enzymes as a major target of the inflammatory process. *Am J Gastroenterol* 2010; 105:2060-2071.
- [156] Sei Y, Kustova Y, Li Y, Morse HC 3rd, Skolnick P and Basile AS. The encephalopathy associated with murine acquired immunodeficiency syndrome. *Ann NY Acad Sci* 1998; 840:822-834.

[157] Mehla R, Bivalkar-Mehla S, Nagarkatti M and Chauhan A. Programming of neurotoxic cofactor CXCL-10 in HIV-1-associated dementia: abrogation of CXCL-10-induced neuro-glial toxicity in vitro by PKC activator. *J Neuroinflammation* 2012; 9:239.

[158] Pereda J, Escobar J, Sandoval J, Rodríguez JL, Sabater L, Pallardó FV, Torres L, Franco L, Viña J, López-Rodas G and Sastre J. Glutamate cysteine ligase up-regulation fails in necrotizing pancreatitis. *Free Radic Biol Med* 2008; 44:1599-1609.

[159] Haddad JJ and Harb HL. L-gamma-Glutamyl-L-cysteinyl-glycine (glutathione; GSH) and GSH-related enzymes in the regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines: a signaling transcriptional scenario for redox(y) immunologic sensor(s)? *Mol Immunol* 2005; 42:987-1014.

[160] Gahl WA, Tietze F, Butler JD and Schulman JD. Cysteamine depletes cystinotic leucocyte granular fractions of cystine by the mechanism of disulphide interchange. *Biochem J* 1985; 228:545-550.

[161] Kannan R, Yi JR, Tang D, Li Y, Zlokovic BV and Kaplowitz N. Evidence for the existence of a sodium-dependent glutathione (GSH) transporter. Expression of bovine brain capillary mRNA and size fractions in *Xenopus laevis* oocytes and dissociation from gamma-glutamyltranspeptidase and facilitative GSH transporters. *J Biol Chem* 1996; 271:9754-9758.